

# Biochimie Hématologie

3e édition

Tome 2

Pharmacie - Biologie :
- Concours de l'Internat
- Formation continue

Collection dirigée par
Michel VAUBOURDOLLE

COLLECTION LE MONITEUR INTERNAT

Tome 2

# Biochimie
# Hématologie

**3e édition**

Collection dirigée par
**Michel VAUBOURDOLLE**



COLLECTION
LE MONITEUR
INTERNAT





1, rue Eugène et Armand Peugeot
92856 Rueil-Malmaison cedex
ISBN : 978-2-915585-39-1

# Comité éditorial

# Avant-propos

Le Moniteur Internat est devenu pour les étudiants en Pharmacie qui souhaitent passer le Concours de l'Internat en Pharmacie un outil de référence comportant les connaissances essentielles, accompagnées d'applications pratiques. C'est également pour les pharmaciens et les biologistes une base de formation continue rassemblant l'essentiel des disciplines pharmaceutiques.

Pour continuer la double action qui actualise l'ensemble des disciplines de la biologie et de la pharmacie et qui permet aux étudiants de disposer d'un outil performant, nous avons rassemblé l'ensemble des questions figurant au programme de l'Internat en Pharmacie dans quatre volumes.
Ces ouvrages constituent la troisième édition de la collection du Moniteur Internat. La rubrique « Vérifiez vos connaissances », qui comprend notamment des QCM et des cas cliniques, a été actualisée, enrichie et sera prochainement disponible en ligne sur www.WK-pharma.fr.

Le premier tome, « Toxicologie, Sciences Mathématiques, Physiques et Chimiques », regroupe l'essentiel des questions fondamentales ou analytiques ainsi que la Toxicologie.
Le deuxième tome, centré sur la Biologie, comporte la Biochimie et l'Hématologie.
La Biologie et la Pharmacie se retrouvent dans le troisième tome, consacré à l'Infectiologie : celui-ci rassemble les questions d'Immunologie, de Bactériologie, de Virologie, de Mycologie, de Parasitologie, d'Hygiène et de Prévention ainsi que les médicaments associés.
Enfin, le quatrième et dernier tome est ciblé sur le Médicament au sens le plus général : Physiologie, Pharmacologie, Pharmacie Clinique.

Dr Michel VAUBOURDOLLE
*Biologiste des Hôpitaux*
*Directeur de Collection*

# Préface

En relisant le sommaire de cet ouvrage, je prends mieux conscience de sa richesse et de sa diversité. En effet, au-delà des principales disciplines, Biochimie, Physiologie, Hématologie, que vous allez retrouver dans cet ouvrage, sont également abordés des aspects de Génétique et des aspects plus analytiques. Si cet inventaire peut donner au premier abord l'impression d'une certaine forme de dispersion, il faut cependant clairement avoir conscience que ces disciplines sont en fait toutes liées, la physiologie constituant un socle fondamental sur lequel de nombreuses autres disciplines se sont progressivement construites.

En relisant ce sommaire, je prends également conscience de la difficulté d'un tel ouvrage qui repose sur le principe qu'il faut à la fois y aborder des questions de type fondamental (connaissances physico-chimiques, structurales, analytiques), de type physiologique (physiologie d'organes ou approche par type de métabolisme), de type physio-pathologique (maladies d'organe et malades systémiques) et enfin de type thérapeutique. Cette difficulté est liée bien sûr aux sections très transversales du programme du concours de l'internat créant ainsi un découpage très artificiel d'un certain nombre de disciplines. Pour autant, les auteurs de cet ouvrage se sont toujours attachés à répondre de la façon la plus efficiente et la plus pertinente à la liste des questions définies dans ce programme de l'internat. Ceci nous paraît essentiel car l'objectif clairement affiché est d'aider, de la façon la plus fructueuse possible, les étudiants à la préparation de ce concours. A cet effet, la plupart des chapitres de cet ouvrage ont été très profondément modifiés et bien sûr complètement actualisés.

Je tiens enfin à remercier très chaleureusement l'ensemble des rédacteurs de cet ouvrage pour la qualité du travail accompli ainsi que Michel Vaubourdolle qui assure avec compétence et passion la direction de cette collection.

Dominique PORQUET

*Doyen de la Faculté de Pharmacie Paris XI, Châtenay-Malabry*

# Sommaire

## Première partie : Biochimie

### Génétique



### Biochimie fondamentale

## Physiologie



## Biochimie analytique et clinique

## Hématologie clinique



**Hémostase**

## Thérapeutique

## Première partie :

# Biochimie



# Génétique

# Caryotype

G. TACHDJIAN, Service d'histologie, embryologie, cytogénétique,
Hôpital Antoine Béclère, AP-HP, Clamart.

*Le caryotype permet l'analyse numérique et structurale des chromosomes humains. Les chromosomes sont le support du matériel génétique. Ils interviennent dans l'hérédité puisque chaque individu possède, pour chaque paire de chromosomes homologues, un chromosome d'origine maternelle et un autre d'origine paternelle. Ils interviennent aussi dans la structure et le fonctionnement des cellules.*
*La discipline qui étudie les chromosomes correspond à la cytogénétique. Depuis la découverte du nombre exact de chromosomes dans l'espèce humaine par Joe Hin Tjio et Albert Levan en 1956, la cytogénétique s'est développée dans de nombreux domaines de la médecine pour l'étude des anomalies chromosomiques. Les principales indications du caryotype concernent les enfants affectés de malformations et/ou de dysmorphies et/ou de retard mental, leurs parents, les sujets infertiles, le dépistage anténatal des anomalies chromosomiques, les cancers et les leucémies. La cytogénétique est aussi très utilisée pour la cartographie des gènes sur les chromosomes.*
*Les méthodes de cytogénétique se sont considérablement développées, englobant les techniques de cytogénétique classique (bandes chromosomiques) et les techniques de cytogénétique moléculaire (sondes chromosomiques). Ces techniques permettent d'analyser actuellement les chromosomes avec une grande précision et peuvent être appliquées à tous les tissus quel que soit le stade du cycle cellulaire.*

# I. Cycle cellulaire, mitose et méiose

Il existe deux types de division cellulaire dans l'organisme : la mitose et la méiose.

## A. La mitose

Il s'agit du mécanisme par lequel le contenu en chromosomes d'une cellule somatique se maintient constant au cours des divisions cellulaires successives. Avant les divisions cellulaires, les cellules répliquent leur ADN au cours d'une période du cycle cellulaire appelée « phase S ». Cette réplication est suivie d'une phase G2 qui précède la mitose. La mitose est divisée en quatre stades :
- prophase ;
- métaphase ;
- anaphase ;
- télophase.

En *prophase*, les chromosomes sont des structures visibles en microscopie sous forme de filaments longs, fins et enchevêtrés. En métaphase, la membrane nucléaire disparaît et les chromosomes comportant deux chromatides sont condensés et individualisés. À l'*anaphase*, les chromatides sœurs se séparent et migrent à chaque pôle de la cellule. En *télophase*, les chromosomes se décondensent. Par le processus de la mitose, il y a une distribution égale du matériel chromosomique dans les cellules filles (46 chromosomes). Après la mitose, la cellule entre en phase G1. Les phases G1, S, et G2 constituent l'interphase.

## B. La méiose

Ce processus se déroule uniquement dans les cellules de la lignée germinale dans les gonades (ovaires ou testicules). La méiose permet la formation de gamètes haploïdes (23 chromosomes) après deux divisions successives d'une cellule diploïde (46 chromosomes). La première division de méiose (méiose I) est une division réductionnelle avec formation de cellules filles contenant 23 chromosomes et 2n quantité d'ADN à partir d'une cellule contenant 46 chromosomes et 4n quantité d'ADN. La deuxième division de méiose (méiose II) est une division équationnelle avec formation de cellules filles contenant 23 chromosomes et 1n quantité d'ADN. Au cours de la méiose, il y a appariement des chromosomes homologues pour former des bivalents au niveau desquels vont se réaliser les recombinaisons génétiques. Ainsi, les chromosomes présents dans les gamètes sont des chromosomes recombinés à partir des chromosomes de l'individu.

# II. Nomenclature et structure des chromosomes

On appelle « caryotype » l'ensemble des chromosomes qui contiennent le génome d'un individu. Le nombre et la structure des chromosomes sont caractéristiques d'une espèce donnée. Le caryotype humain normal comporte 46 chromosomes. Dans l'espèce humaine, il existe 22 paires d'autosomes (1 à 22), et une paire de gonosomes ou chromosomes sexuels (X, Y). La formule chromosomique normale est 46,XX chez la femme et 46,XY chez l'homme. Les 24 chromosomes du génome sont caractérisés par leur taille, la position de leur centromère et leur profil de bandes.

Chaque chromosome comporte un centromère qui contient le kinétochore correspondant au centre d'organisation des microtubules responsable de la fixation des chromosomes au fuseau mitotique lors de la mitose. En métaphase, les deux chromatides sœurs sont unies au niveau du centromère (*fig. 1*).

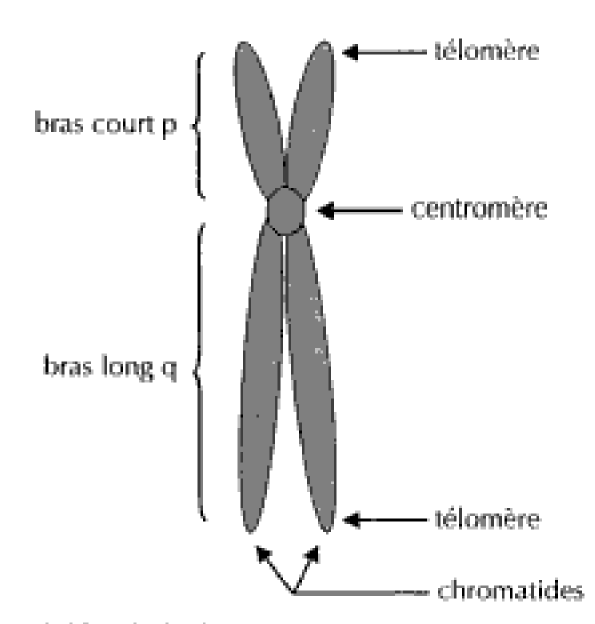



**Figure 1.** Morphologie des chromosomes en métaphase

De part et d'autre du centromère, une chromatide présente deux bras : le bras court appelé « p », placé en haut sur un caryotype, et le bras long appelé « q », placé en dessous du centromère. Si le bras court est presque aussi long que le bras long, le chromosome est dit « métacentrique ». S'il est nettement plus court, le chromosome est dit « submétacentrique ». Enfin, si ce bras p est très petit, le chromosome est dit « acrocentrique ». Les chromosomes acrocentriques sont les chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22. Les chromosomes acrocentriques portent sur leurs bras courts de l'hétérochromatine et des régions impliquées dans l'organisation nucléolaire (NOR) et codant pour l'ARN ribosomal (également appelé « ARN ribosomial »).
Chaque extrémité des chromosomes au niveau des bras courts (p) et des bras longs (q) se termine par un télomère, séquence d'ADN répétitive hautement conservée qui empêche les fusions avec d'autres chromosomes. Ces séquences ont aussi un rôle dans l'attachement des télomères à l'enveloppe nucléaire, en particulier lors de la méiose. Le raccourcissement des télomères est un phénomène associé au vieillissement cellulaire.
Chaque bras d'un chromosome est arbitrairement divisé en régions, notées de 1 à 4 (pour certains chromosomes) en partant du centromère (*fig.* 2).
Chaque région est divisée en bandes, entités visibles pâles ou foncées après usage des techniques de dénaturation. Chaque bande peut, si nécessaire, être divisée en sous-bandes (chromosomes en prophase, moins condensés, et donc montrant plus de détails). Ainsi, une localisation sur un chromosome sera définie par le numéro du chromosome où se trouve cette localisation, suivi de la lettre indiquant le bras impliqué (p ou q), suivie des numéros de région, de bande, voire de sous-bande.

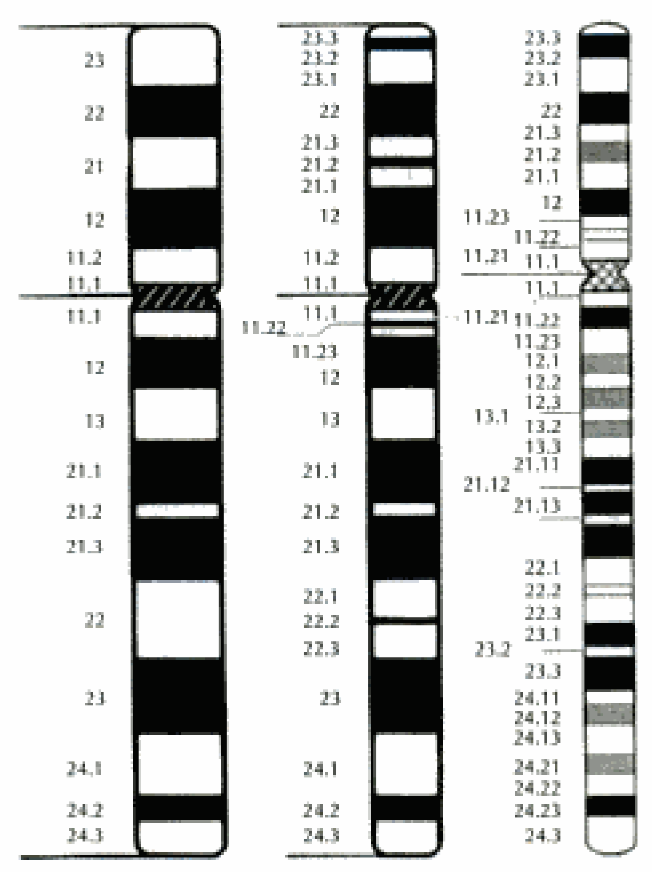



**Figure 2.** Idéogramme du chromosome 8 en bandes G montrant les différentes régions, bandes et sous bandes chromosomiques en fonction de la résolution de l'analyse chromosomique

# III. Techniques cytogénétiques

Les chromosomes sont visibles en microscopie optique lorsqu'ils sont compactés au stade de la métaphase. Un caryotype standard nécessite donc une culture cellulaire pour obtenir des cellules en division (*fig. 3*).

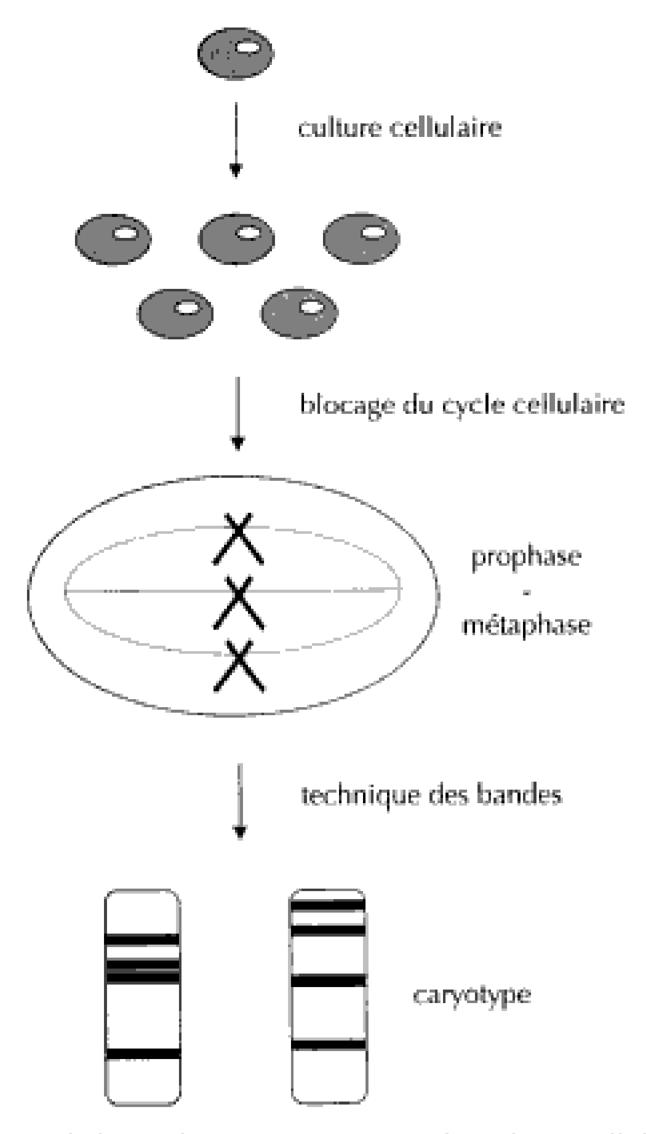



**Figure 3.** Obtention du caryotype après culture cellulaire

## A. Cellules utilisées

Un caryotype standard peut être établi à partir de n'importe quel tissu dont les cellules peuvent se diviser. Les cellules les plus fréquemment utilisées chez l'homme sont les lymphocytes, les cellules de la moelle osseuse, les cellules de liquide amniotique, les cellules trophoblastiques et les fibroblastes. Les cellules sont cultivées *in vitro* en présence de milieux de culture. Les conditions et les durées de culture sont différentes selon le type cellulaire.

D'autres cellules comme les gamètes et les cellules embryonnaires peuvent être analysées en utilisant plus particulièrement les techniques de cytogénétique moléculaire.

## 1. Lymphocytes

Le sang total est placé dans un milieu nutritif en solution dans un tube. Les lymphocytes sont activés par l'utilisation d'un mitogène, la phytohémagglutinine. Les lymphocytes sont incubés pendant 48 à 72 heures à 37 °C.

## 2. Cellules de la moelle osseuse

En oncohématologie, le caryotype des cellules malignes est un examen indispensable. Son étude nécessite un prélèvement de moelle osseuse. La méthodologie est similaire à celle des lymphocytes mais sans utilisation de mitogènes.

## 3. Cellules amniotiques

Après centrifugation, le culot cellulaire obtenu est mis en culture dans des flacons en plastique ou sur des lames à 37 °C sous atmosphère contrôlée (5 % $CO_2$). Les cellules adhèrent au support et se multiplient en formant des clones cellulaires. Lorsque la taille des clones cellulaires est suffisante (au bout de, en moyenne, une semaine), les cellules sont traitées pour l'obtention des chromosomes.

## 4. Cellules trophoblastiques

Les cellules trophoblastiques sont prélevées par biopsie de villosités choriales. Les cellules trophoblastiques se divisent activement et il est donc possible d'obtenir des métaphases en réalisant un examen direct sans culture cellulaire le jour même de la biopsie.

## 5. Fibroblastes

Les fibroblastes sont obtenus après biopsie de tissu le plus souvent cutané. Les explants cutanés sont répartis dans des boîtes plastiques. Les cultures sont incubées à 37 °C sous atmosphère contrôlée (5 % $CO_2$). Lorsque la taille des clones cellulaires est suffisante (au bout de, en moyenne, une semaine), les cellules sont décollées du support plastique par action enzymatique.

## 6. Gamètes

Le contenu chromosomique des ovocytes et des spermatozoïdes peut être analysé par les techniques de cytogénétique classique et moléculaire.

## 7. Cellules embryonnaires

Après fécondation *in vitro*, les cellules embryonnaires (blastomères) peuvent être biopsiées sur un embryon au troisième jour de développement. Les blastomères biopsiés sont fixés sur des lames de verre. La recherche d'anomalies chromosomiques ou le diagnostic de sexe dans le cadre d'un diagnostic cytogénétique préimplantatoire sont ensuite réalisés en utilisant les techniques d'hybridation *in situ* fluorescente avec des sondes chromosomiques.

## B. Obtention des préparations chromosomiques

Les cellules cultivées sont bloquées au stade de la métaphase en utilisant un poison du fuseau mitotique, la colchicine. Un choc hypotonique est ensuite réalisé pour permettre une dispersion modérée des chromosomes et éviter un enchevêtrement des chromosomes. Après plusieurs fixations à l'alcool et à l'acide acétique, les chromosomes sont étalés sur des lames de verre. Après la réalisation des techniques de dénaturation des chromosomes, les préparations chromosomiques sont colorées et analysées en microscopie.

## C. Marquages en bandes

Le marquage en bandes permet d'obtenir des bandes claires et sombres le long des chromosomes. Le profil de ces bandes est caractéristique d'un chromosome donné. Le caryotype standard comporte trois cents à quatre cents bandes par génome haploïde (soit 23 chromosomes). La taille d'une bande observée dans un caryotype standard est de l'ordre de 10 à 20 mégabases (1 mégabase est égale à 1 million de paires de bases).

Les principaux types de marquage de bandes sont :

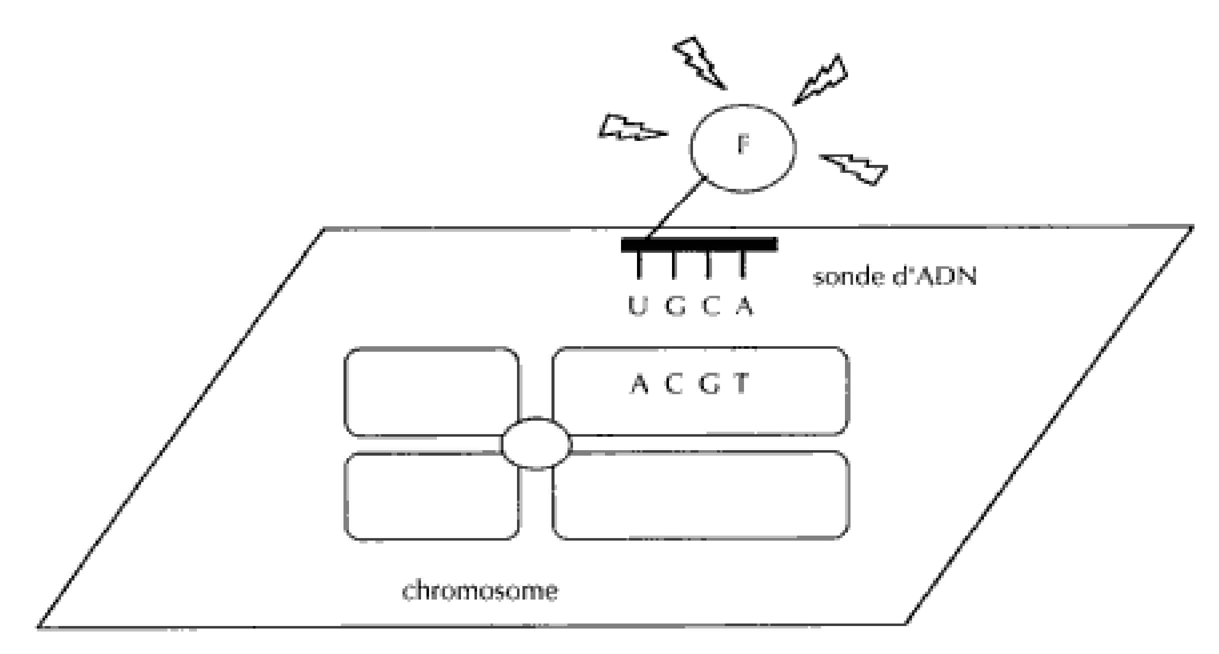
- le marquage en bandes Q utilisant un fluorochrome, la quinacrine. Les régions chromosomiques fluorescentes en bandes Q sont caractérisées par leur richesse en séquences AT ;
- le marquage en bandes G est obtenu par digestion enzymatique (trypsine) des chromosomes suivie d'une coloration au Giemsa. La répartition des bandes G est similaire à celle des bandes Q ;
- le marquage en bandes R est obtenu par dénaturation thermique des chromosomes suivie d'une coloration au Giemsa. Le marquage est inversé à celui des bandes G. Les bandes R sont riches en séquences GC. Elles correspondraient aux régions chromosomiques comportant un plus grand nombre de gènes ;
- le marquage en bandes C est spécifique des régions centromériques et de l'hétérochromatine des chromosomes 1, 9, 16 et Y ;
- le marquage en bandes T est spécifique des régions télomériques des chromosomes.

## D. Caryotype haute résolution

Des techniques plus résolutives ont été développées pour obtenir des chromosomes au stade de la prométaphase. Les chromosomes sont ainsi moins condensés qu'au stade de la métaphase. Après marquages de bandes R ou G, on obtient des caryotypes de six cents à huit cents, voire mille bandes et sous-bandes par lot haploïde. La taille d'une sous-bande pouvant être observée par les techniques de haute résolution est de l'ordre de 2 à 5 mégabases. Le caryotype à haute résolution permet de détecter des remaniements de petite taille comme des délétions interstitielles. Il permet aussi de définir de façon plus précise les points de cassure dans les translocations.

## E. Hybridation *in situ* fluorescente (FISH)

La FISH est une technique fondée sur le principe de la complémentarité des nucléotides. Cette technique permet de visualiser et de localiser un fragment d'ADN sur les chromosomes par hybridation de la séquence d'ADN complémentaire appelée « sonde » (*fig. 4*). Ces sondes sont marquées par l'incorporation de nucléotides modifiés chimiquement (biotine, digoxigénine). Ce couplage du nucléotide à un haptène rend la sonde antigénique et permet ainsi une détection de l'hybridation par une réaction immunocytochimique utilisant des anticorps fluorescents. La possibilité d'utiliser des nucléotides couplés à un fluorochrome permet une détection directe de la sonde. La sonde marquée et l'ADN cible (chromosomes métaphasiques ou noyaux interphasiques) sont dénaturés avant de réaliser l'hybridation. L'hybridation non spécifique de séquences répétées pouvant être présentes dans la sonde est éliminée par l'utilisation d'ADN Cot1. L'hybridation ADN cible-sonde est effectuée à 37 °C en chambre humide, pendant une nuit le plus souvent. Après hybridation, des lavages sont réalisés pour éliminer l'excès de sonde non lié à l'ADN cible. Ensuite, les signaux d'hybridation sont observés en microscopie à épifluorescence. L'utilisation de fluorochromes différents permet de réaliser une FISH multicouleurs dans le dessein d'analyser plusieurs chromosomes dans une même cellule.




A : adénine
C : cytosine
T : thymidine
G : guanine
U : uridine
F : fluorochrome

**Figure 4.** Principe de l'hybridation *in situ* fluorescente d'une sonde d'ADN sur chromosome

Les progrès en biologie moléculaire rendent maintenant possible la fabrication d'une grande variété de sondes chromosomiques (*fig. 5*). Les sondes utilisées pour la FISH sont équivalentes à celles utilisées pour les autres méthodes de biologie

moléculaire. Elles doivent être complémentaires de l'acide nucléique cible et doivent être marquées pour permettre leur détection. Différents types de sondes correspondant à des régions chromosomiques précises peuvent être utilisés.

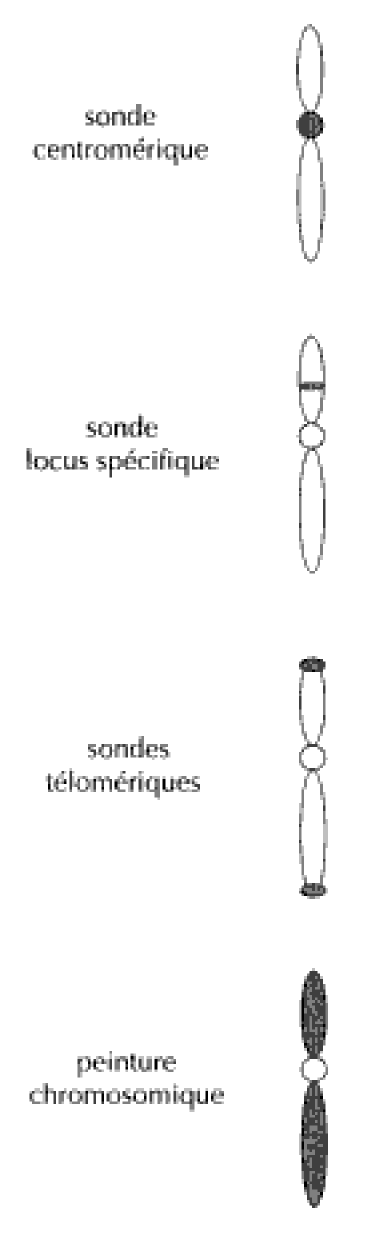
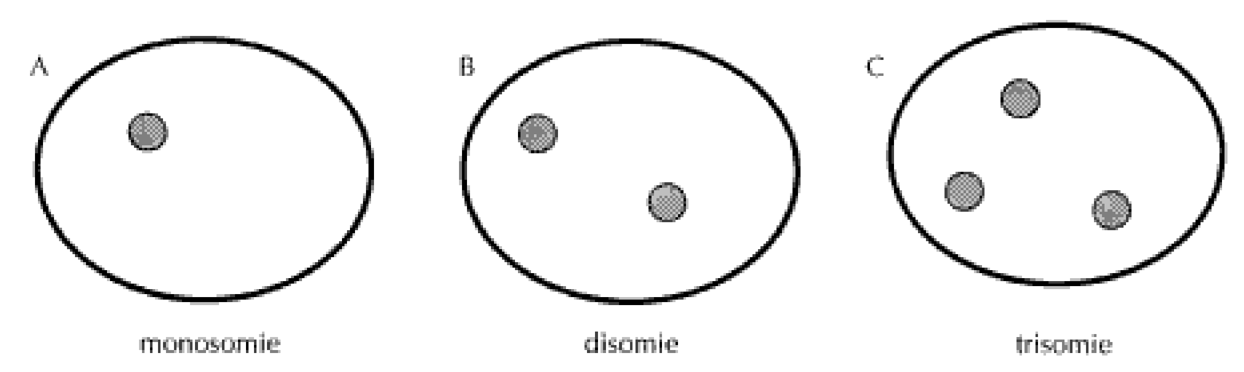



**Figure 5.** Sondes chromosomiques utilisées en FISH

Les *sondes centromériques* reconnaissent les séquences d'ADN satellite α et β localisées dans les régions centromériques ou péricentromériques des chromosomes. Les séquences alphoïdes, situées au niveau des régions centromériques des chromosomes, sont le plus souvent utilisées pour la détection des aneuploïdies. Elles comportent une séquence spécifique de 171 paires de bases caractéristiques à chaque chromosome dont l'arrangement linéaire en tandem est propre à un chromosome donné. L'utilisation de ce type de sonde permet de dénombrer facilement les chromosomes dans les noyaux en interphase (*fig.* 6). Cela permet de détecter rapidement dans un grand nombre de cellules des anomalies du nombre des chromosomes et ne nécessite pas de culture cellulaire puisque les chromosomes sont accessibles aux sondes en interphase.




Un signal d'hybridation (A) correspond à une monosomie, deux signaux d'hybridation (B) à une disomie, trois signaux d'hybridation (C) à une trisomie.

**Figure 6.** Analyse des cellules en interphase par FISH avec une sonde centromérique d'un chromosome donné

Les *sondes spécifiques d'un locus donné* correspondent à des séquences d'ADN. Elles sont insérées selon les cas dans des vecteurs de type plasmide, phage, cosmide, chromosome artificiel de levure (YAC) ou chromosome artificiel bactérien (BAC). La taille des fragments d'ADN utilisés comme sonde varie en général d'une vingtaine de kilobases (vingt mille paires de bases) à 2 000 kilobases (deux millions de paires de bases). L'utilisation de ces sondes permet de détecter des petites délétions, insertions ou inversions, non visibles par l'étude du caryotype standard ou du caryotype en haute résolution.
Les *sondes télomériques* sont spécifiques des extrémités terminales des bras court et long des chromosomes. Elles permettent de mettre en évidence des anomalies chromosomiques impliquant les régions télomériques des chromosomes, difficiles à visualiser avec les techniques de bandes.
Les *sondes de peinture chromosomique* sont spécifiques d'un chromosome entier ou d'une région chromosomique. Elles correspondent à l'association de sondes spécifiques d'un même chromosome et permettent de visualiser une partie ou la totalité de ce chromosome. Celles-ci peuvent être obtenues par PCR à partir de chromosomes triés par cytométrie en flux, soit à partir d'hybride cellulaire interspécifique, soit par microdissection chromosomique. Ce type de sonde est utilisé en particulier pour l'étude des translocations chromosomiques. Ces différents types de sondes peuvent être utilisés sur les chromosomes métaphasiques ou dans les noyaux interphasiques de cellules non cultivées. L'analyse en interphase est particulièrement utile pour les tissus dont la culture est difficile à induire *in vitro*. De nombreux tissus peuvent être analysés par FISH, comme les cellules hématopoïétiques (sang, moelle), les cellules amniotiques, les cellules trophoblastiques, les fibroblastes, les gamètes, les blastomères ou les cellules tumorales.

## F. Hybridation génomique comparative

L'hybridation génomique comparative (CGH) est une technique d'hybridation *in situ* modifiée qui permet la détection et la cartographie du ratio d'hybridation entre deux génomes en une seule expérience. Dans l'analyse par CGH, deux ADN génomiques (test et référence) marqués par deux fluorochromes différents sont cohybridés sur des métaphases normales ou sur des puces à ADN. La localisation de modi-

fications de séquences d'ADN de l'échantillon test est révélée par une variabilité du ratio des intensités de fluorescence le long de chaque chromosome ou au niveau des clones d'ADN de la puce à ADN. Depuis son développement, la CGH a été appliquée comme outil de recherche dans le domaine de la cytogénétique cancérologique pour caractériser des modifications génétiques dans des régions chromosomiques inconnues auparavant. La CGH est aussi utilisée en cytogénétique clinique pour la détection et l'identification des anomalies chromosomiques déséquilibrées.

### G. Caryotype en flux

La cytométrie en flux est une technique qui permet d'analyser des cellules en suspension selon leurs tailles et leurs fluorescences. En utilisant cette technique, les chromosomes peuvent être caractérisés en fonction de leur longueur et de leur contenu en ADN permettant d'établir un caryotype en flux. Un caryotype en flux peut être suivi d'un tri permettant de recueillir chaque chromosome de façon isolée.

## IV. Anomalies chromosomiques

Le caryotype permet de mettre en évidence des anomalies du nombre des chromosomes et des anomalies de la structure des chromosomes. Ces anomalies chromosomiques peuvent être constitutionnelles ou acquises, homogènes ou en mosaïque.

### A. Anomalies constitutionnelles

Les différents organes d'un individu ont la même anomalie chromosomique. L'accident chromosomique existait déjà chez l'embryon. Il s'est produit avant la fécondation, dans l'un des gamètes, ou peu après, dans une des cellules du zygote. Le sujet porteur d'une anomalie chromosomique déséquilibrée a souvent une dysmorphie et/ou des malformations viscérales, et/ou un retard du développement psychomoteur.

### B. Anomalies acquises

L'anomalie chromosomique est observée dans un seul organe, les autres organes sont normaux. Cette anomalie est survenue au cours de la vie de l'individu. Elle est acquise par rapport au caryotype constitutionnel. L'anomalie chromosomique acquise est le plus souvent associée à un processus cancéreux sur l'organe impliqué.

### C. Anomalies homogènes

Une anomalie chromosomique homogène est une anomalie chromosomique présente dans toutes les cellules du tissu analysé.

## D. Anomalies en mosaïque

Une anomalie chromosomique en mosaïque correspond à la présence de deux (ou plus) populations cellulaires à contenu chromosomique différent mais provenant du même zygote. Le caryotype d'un clone cellulaire dans une mosaïque doit être observé dans au moins 2 % des cellules analysées. Une mosaïque peut être observée dans un tissu et pas dans un autre. Ainsi, en cas de suspicion d'une anomalie chromosomique en mosaïque chez un individu avec un caryotype sanguin normal, il est nécessaire de réaliser un caryotype à partir d'un prélèvement de cellules provenant d'un autre tissu (par exemple, une biopsie cutanée). Une mosaïque est notée par une barre oblique entre les deux clones décrits (trisomie 21 en mosaïque : 46,XY/47,XY,+21). Le mécanisme de survenue d'une mosaïque est une non-disjonction mitotique postzygotique avec la constitution d'au moins deux lignées cellulaires possédant des caryotypes différents et continuant d'évoluer au sein du même organisme. Ainsi une non-disjonction mitotique survenue au niveau des chromosomes 21 chez un zygote 46,XY après plusieurs divisions cellulaires entraînera-t-elle au niveau d'une cellule fille trois chromatides sur les quatre (trisomie 21), et au niveau de l'autre cellule fille une chromatide (monosomie 21). Les autres cellules du zygote se divisent normalement. Dans cet exemple de la trisomie 21 en mosaïque, le clone monosomique 21, non viable, disparaît.
Les mosaïques sont fréquentes dans les processus cancéreux, soit parce que des cellules normales persistent, soit parce que le clone tumoral engendre des sous-clones porteurs d'anomalies chromosomiques additionnelles, dites aussi « anomalies secondaires » (notion d'évolution clonale). Les mosaïques sont à différencier des chimères qui résultent de la fusion de deux zygotes (ou plus) distincts. Dans les chimères, les génotypes des différentes lignées sont dissemblables. Les anomalies chromosomiques peuvent être des anomalies du nombre des chromosomes ou des anomalies de structure des chromosomes. Elles peuvent impliquer un ou plusieurs chromosomes.

## E. Anomalies de nombre des chromosomes

### 1. Polyploïdies

Les polyploïdies correspondent à un nombre de chromosomes égal à un multiple du complément haploïde de chromosomes. Les seules polyploïdies observées dans l'espèce humaine sont la triploïdie (69 chromosomes) et la tétraploïdie (92 chromosomes). Ces anomalies chromosomiques ont été exceptionnellement décrites chez des nouveau-nés vivants et ne sont jamais viables. Les triploïdies sont fréquemment observées dans les produits d'avortements spontanés précoces. Les tétraploïdies sont plus rares. Le mécanisme de formation des triploïdies est double, soit par digynie (non-expulsion du deuxième globule polaire), soit par diandrie (fécondation d'un ovocyte par deux spermatozoïdes). La diandrie est quatre fois plus fréquente que la digynie.

### 2. Aneuploïdies

Les aneuploïdies sont définies par un nombre de chromosomes supérieur ou inférieur à un multiple d'un complément chromosomique haploïde. Il peut s'agir de

nullisomies (absence totale d'un chromosome), de monosomies (absence d'un chromosome), de trisomies ou de tétrasomies. Les anomalies de nombre les plus fréquentes sont les trisomies et les monosomies.

### a) Les trisomies

Elles correspondent à la présence d'un chromosome surnuméraire (*fig. 7*).

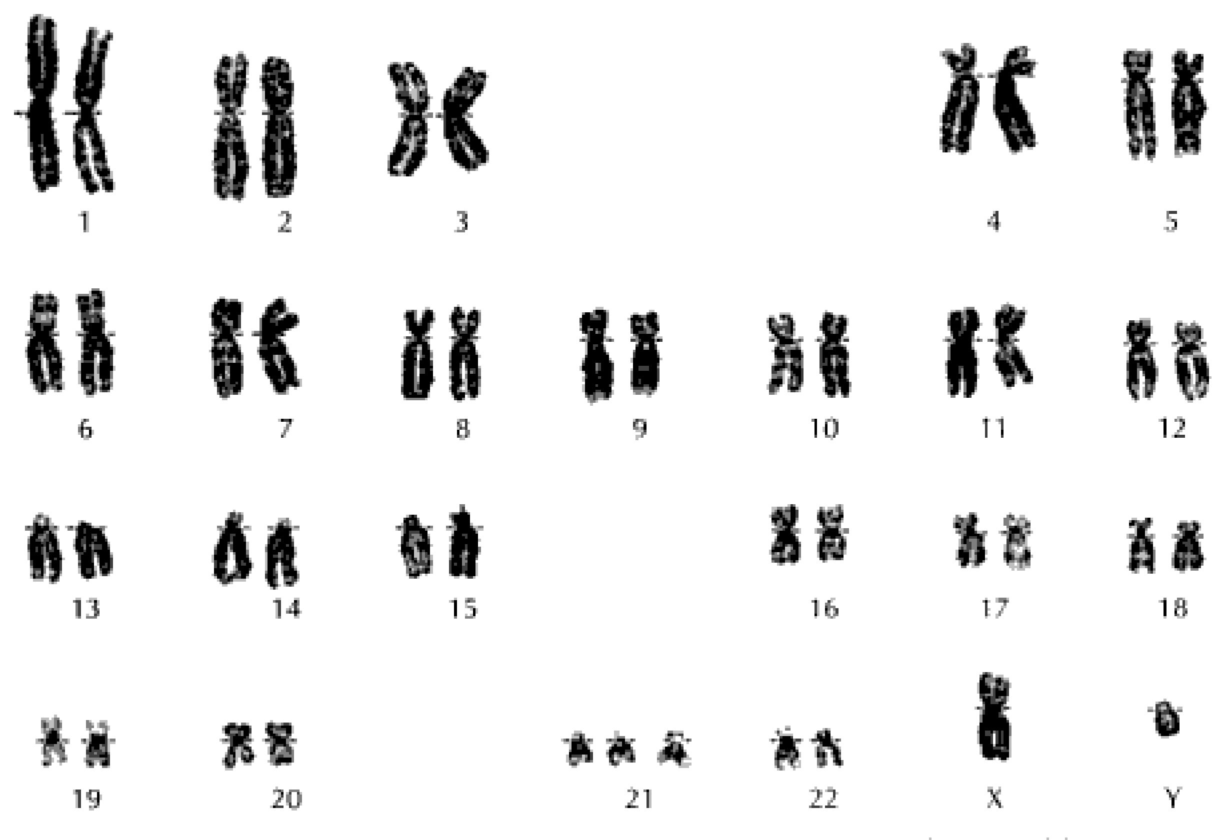
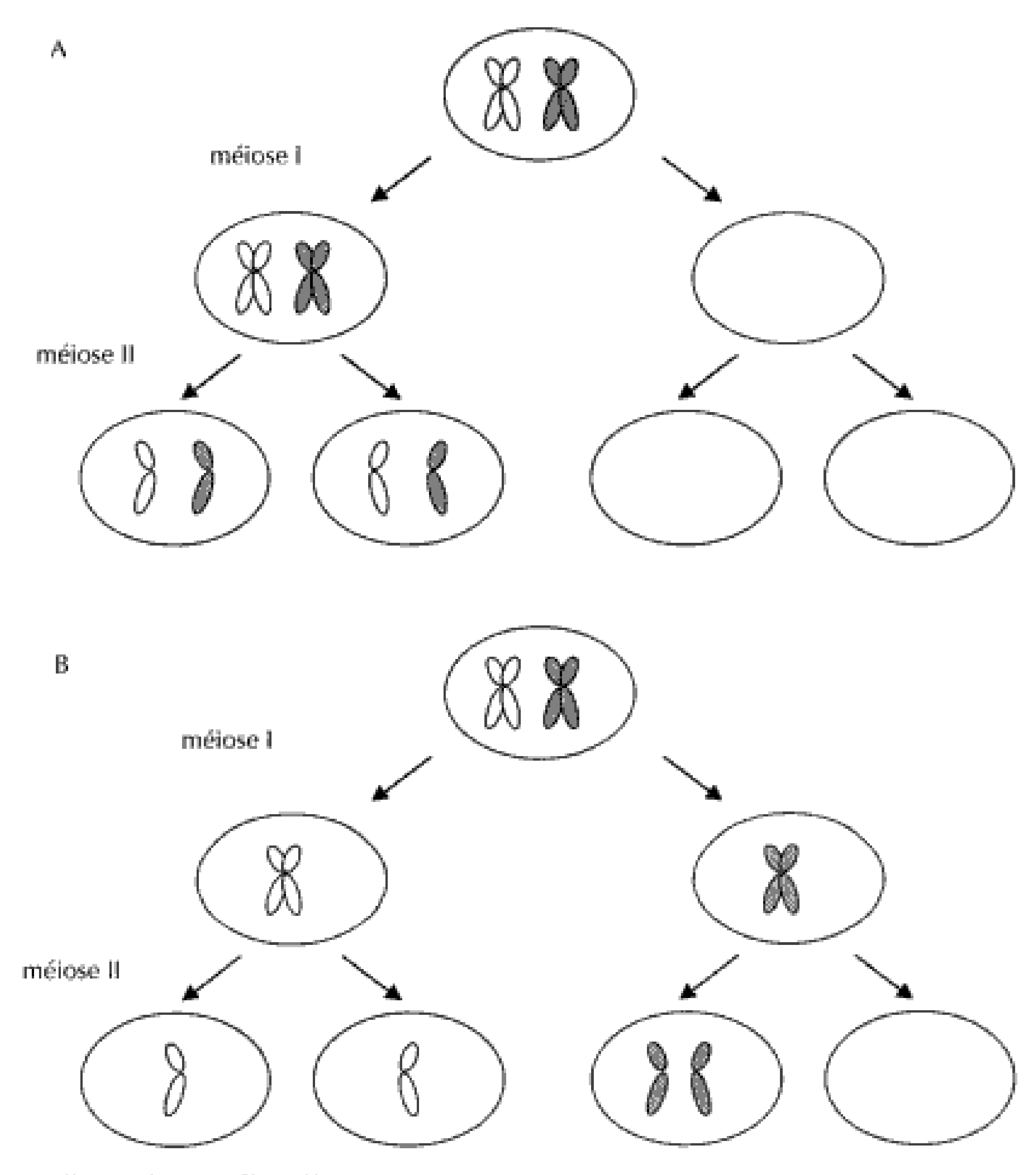



**Figure 7.** Caryotype en bandes G montrant une trisomie 21 (47,XY,+21)

Le caryotype comporte 47 chromosomes. Les trisomies constituent l'anomalie chromosomique la plus fréquente chez l'homme. Elles surviennent dans au moins 4 % des grossesses reconnues cliniquement. Les trisomies peuvent exister pour n'importe quel chromosome, mais la trisomie pour un chromosome entier est rarement compatible avec la vie. La plupart des trisomies sont à l'origine d'avortements précoces du premier trimestre. Les trisomies les plus fréquemment observées à la naissance concernent les chromosomes 13, 18, 21 et les chromosomes sexuels. Ces trisomies sont observées chez 0,3 % des nouveau-nés. Seules la trisomie 21 et les anomalies de nombres des gonosomes sont viables à long terme. La trisomie 16, fréquemment observée dans les produits de fausse-couche, n'est pas compatible avec un développement fœtal à terme.

Ces trisomies dites « libres », non liées à une translocation, ne sont généralement jamais familiales. Elles résultent d'une non-disjonction lors de la division méiotique avec formation d'un gamète porteur d'un chromosome surnuméraire (*fig. 8*). Une non-disjonction en première division de méiose produit quatre gamètes déséquilibrés. Une non-disjonction en deuxième division de méiose produit deux gamètes déséquilibrés et deux gamètes normaux. Il s'agit d'un phénomène très fréquent, compensé le plus souvent par l'élimination précoce du conceptus déséquilibré.




A) en méiose I, B) en méiose II.

**Figure 8.** Non-disjonction méiotique

### b) Les monosomies

Elles correspondent à l'absence d'un chromosome dans les cellules d'un individu. Les monosomies ont un effet délétère plus important sur le développement embryonnaire et entraînent donc des avortements très précoces. Seule la monosomie X (45,X), responsable du syndrome de Turner, peut se développer à terme et être viable.

## F. Anomalies de structure des chromosomes

Les anomalies de la structure des chromosomes sont définies par l'existence d'une ou plusieurs cassures chromosomiques suivies d'une reconstitution des chromosomes remaniés, appelés « dérivés ». Ces remaniements chromosomiques peuvent

survenir spontanément ou être induits par des agents cassant les chromosomes (clastogènes) comme les radiations, certains virus ou certains agents chimiques. Les anomalies de structure sont moins fréquentes que les anomalies de nombre des chromosomes. Elles surviennent dans environ 1/1 200 naissances vivantes. Les différents types d'anomalies de structure des chromosomes observés correspondent aux translocations (*fig. 9*), aux délétions, duplications, inversions, isochromosomes, insertions et anneaux (*fig. 10*).

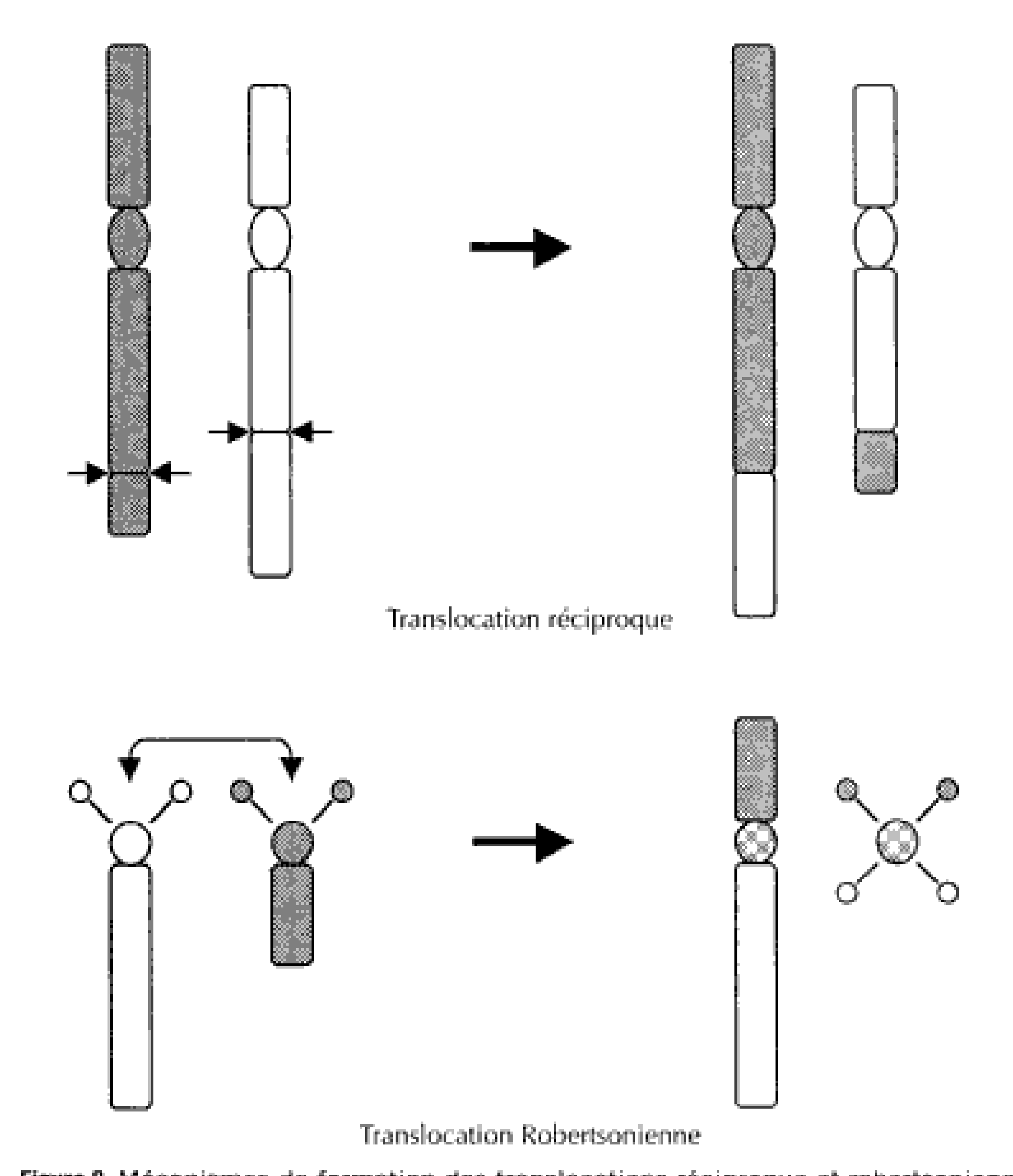



**Figure 9.** Mécanismes de formation des translocations réciproque et robertsonienne

## 1. Translocations

Elles correspondent à des échanges de segments chromosomiques entre deux chromosomes. Il existe deux grands types de translocations : réciproques et Robertsoniennes.

### a) Translocations réciproques

Les translocations réciproques sont dues à la cassure de deux chromosomes non homologues suivie d'un échange réciproque des segments chromosomiques cas-

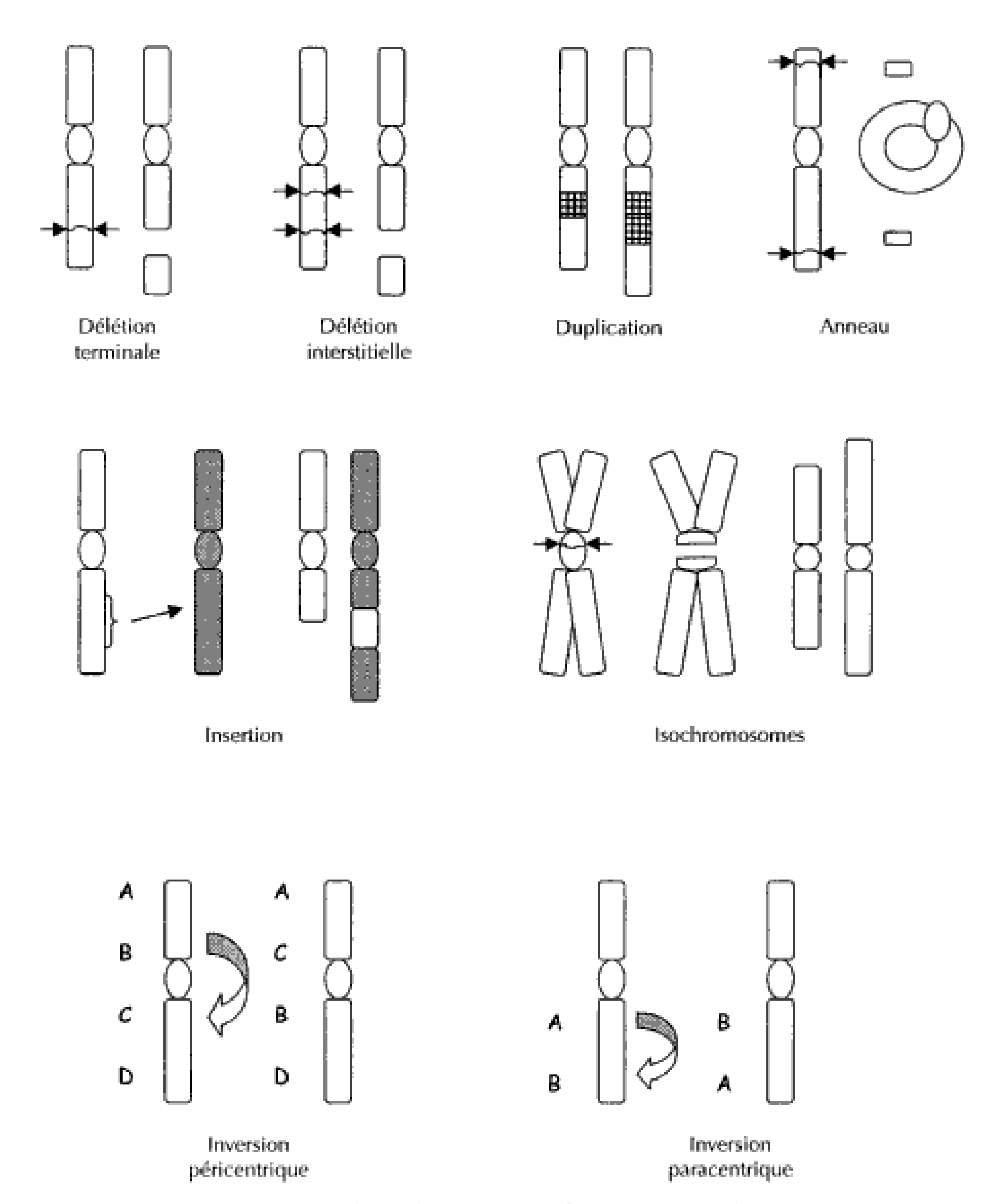



**Figure 10.** Mécanismes de formation des anomalies de structure des chromosomes

sés. Leur fréquence est de 1/1 000 à la naissance. Tous les chromosomes peuvent être concernés par un tel réarrangement. Cependant, la très grande majorité des translocations s'opère entre deux autosomes. Les translocations impliquant un ou deux gonosomes : translocations (X;autosome), (Y;autosome) ou (X;Y) sont exceptionnelles. Le caryotype qui résulte d'une translocation réciproque comporte 46 chromosomes (*fig. 11*). La translocation est dite « équilibrée » s'il n'y a ni perte ni excès de matériel génétique. Dans le cas contraire, la translocation est dite « déséquilibrée ».

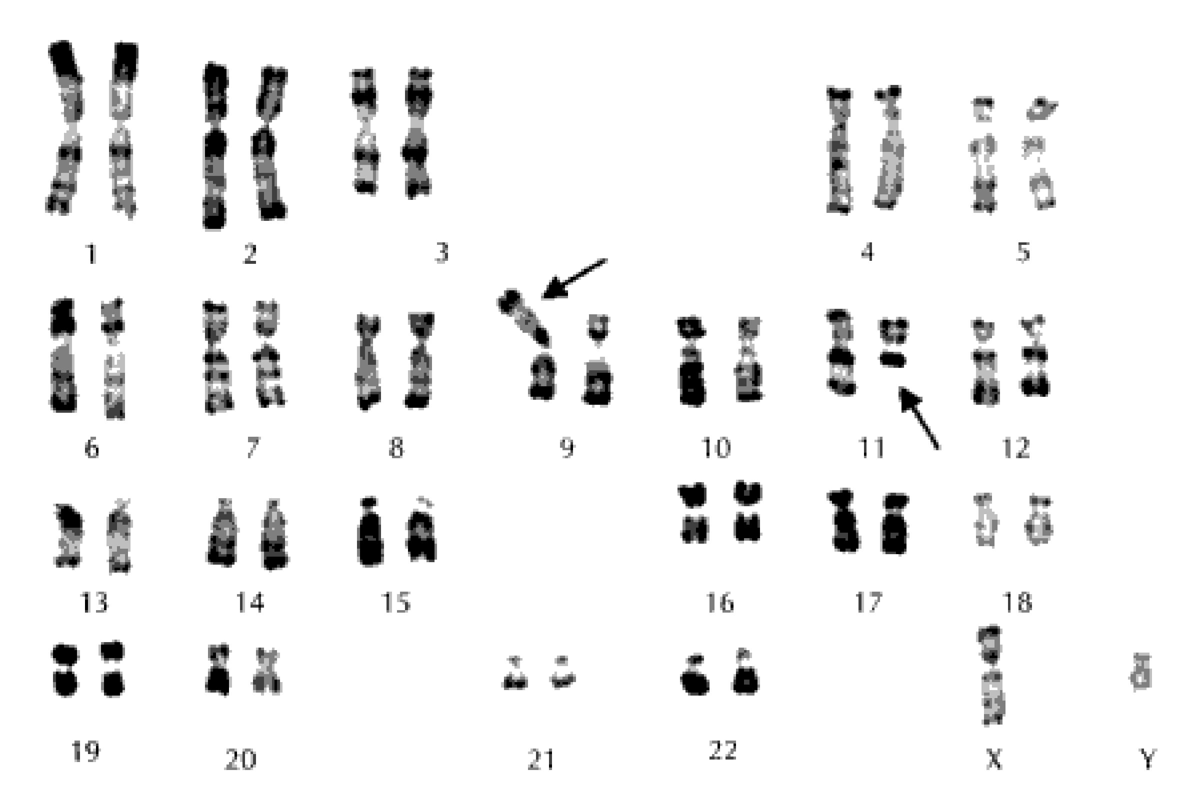
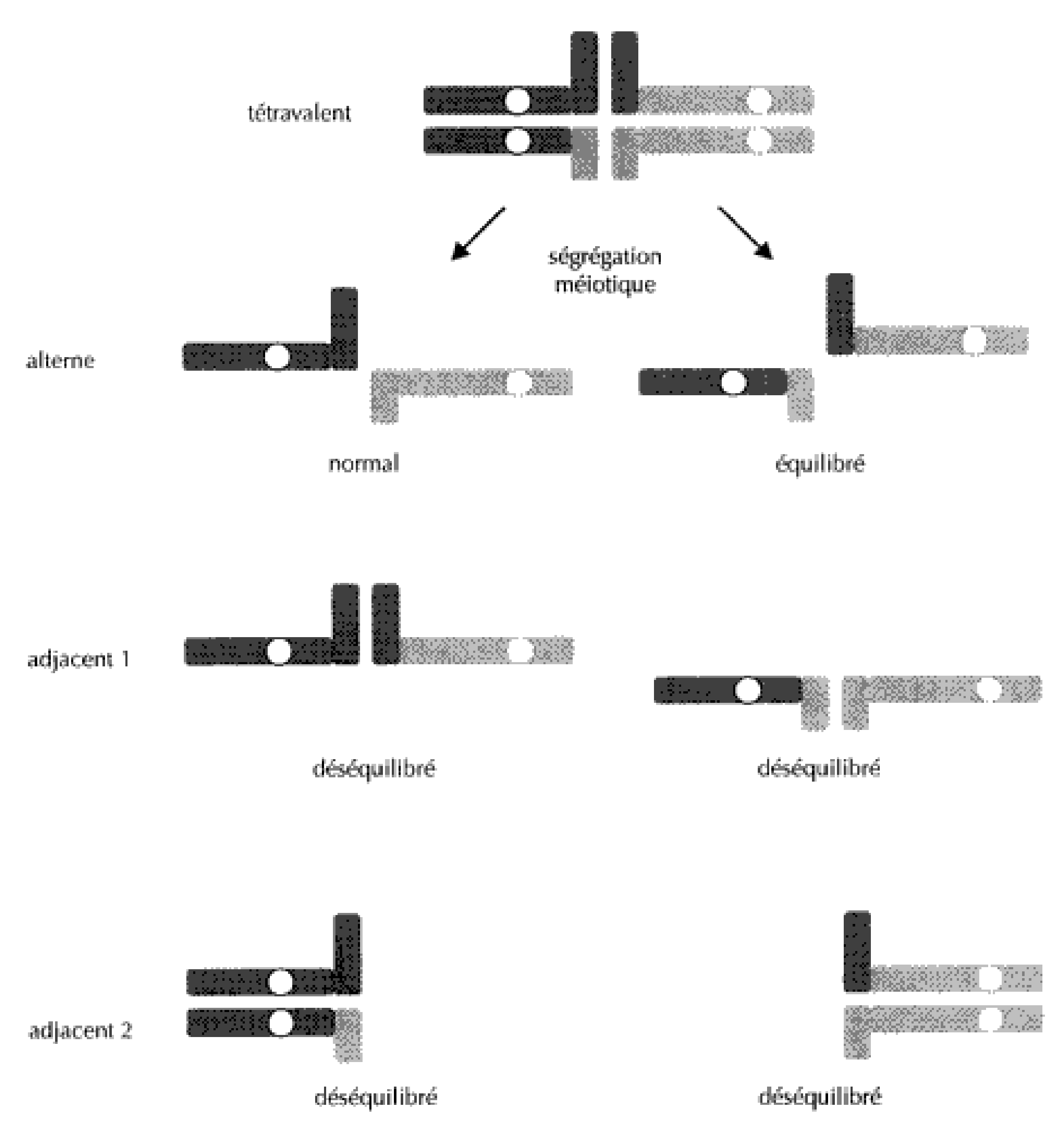



**Figure 11.** Caryotype en bandes R montrant une translocation réciproque entre le bras court d'un chromosome 9 et le bras long d'un chromosome 11 [46,XY,t(9;11)(p23;q13)]. Les flèches indiquent les chromosomes transloqués

Dans environ 90 % des cas de translocations équilibrées, il n'y a pas de conséquences sur le phénotype. Cependant, la ségrégation méiotique des chromosomes transloqués peut être à l'origine de déséquilibres chromosomiques pour la descendance. Les couples dont l'un des conjoints est porteur d'une translocation réciproque équilibrée sont donc à risque de stérilité, de fausses-couches spontanées et d'enfants viables malformés en fonction de la nature et de la taille des segments transloqués. Il est estimé que dans un couple sur six cent, l'un des partenaires est porteur d'une translocation équilibrée.

En méiose, les chromosomes homologues s'apparient normalement en bivalent, permettant les recombinaisons génétiques entre les chromatides. Dans les cas de translocation réciproque, la seule manière d'apparier chaque région chromosomique homologue est de former un tétravalent ou quadrivalent (*fig. 12*). La ségrégation des chromatides à partir du tétravalent peut se faire selon les modes suivants :

- le type alterne associe soit les deux chromosomes normaux, soit les deux chromosomes transloqués produisant ainsi des gamètes normaux, ou porteurs équilibrés de la translocation parentale ;
- le type adjacent 1 associe un chromosome normal avec le chromosome transloqué de l'autre paire ;
- le type adjacent 2 associe un chromosome normal avec son homologue transloqué ;
- le type 3:1 associe soit un chromosome transloqué transmis avec les homologues normaux dans une cellule fille, et l'autre chromosome transloqué dans l'autre cellule, soit un homologue normal transmis avec les deux chromosomes transloqués dans une cellule, et l'autre chromosome normal dans l'autre cellule.




Appariement de la translocation réciproque et des chromosomes homologues sous la forme d'un tétravalent. Le mode alterne produit des gamètes équilibrés. Les modes adjacent -1 et -2 produisent des gamètes déséquilibrés. Les gamètes déséquilibrés sont à l'origine de zygotes avec trisomie partielle et monosomie partielle des chromosomes impliqués dans la translocation.

**Figure 12.** Principaux modes de ségrégation méiotique des translocations réciproques

Dans le type alterne, après fécondation, les zygotes seront équilibrés. Dans les types adjacent 1 et 2, après fécondation, les zygotes comporteront 46 chromosomes et seront déséquilibrés. Dans la ségrégation 3:1, les zygotes formés comporteront 47 ou 45 chromosomes. Le type adjacent 1 est le mode de ségrégation déséquilibrée le plus fréquemment observé.

D'une façon générale, les zygotes déséquilibrés produits sont d'autant moins viables que les segments qui ont été échangés sont plus grands. Le risque moyen de déséquilibre d'une translocation réciproque varie entre 5 et 20 % justifiant un diagnostic prénatal ou même préimplantatoire. Dans 10 % des cas, les translocations

réciproques sont associées à un phénotype anormal (malformations, retard mental). Un des mécanismes possibles est l'existence au niveau des points de cassure d'une microdélétion non visible en caryotype standard ou caryotype à haute résolution. Un autre mécanisme est l'interruption d'une séquence d'un gène au niveau du point de cassure entraînant l'expression d'une maladie dominante autosomique, d'une maladie récessive liée à l'X ou d'une maladie autosomique récessive si l'autre allèle est muté. Les translocations réciproques sont aussi observées de façon fréquente dans les processus cancéreux.

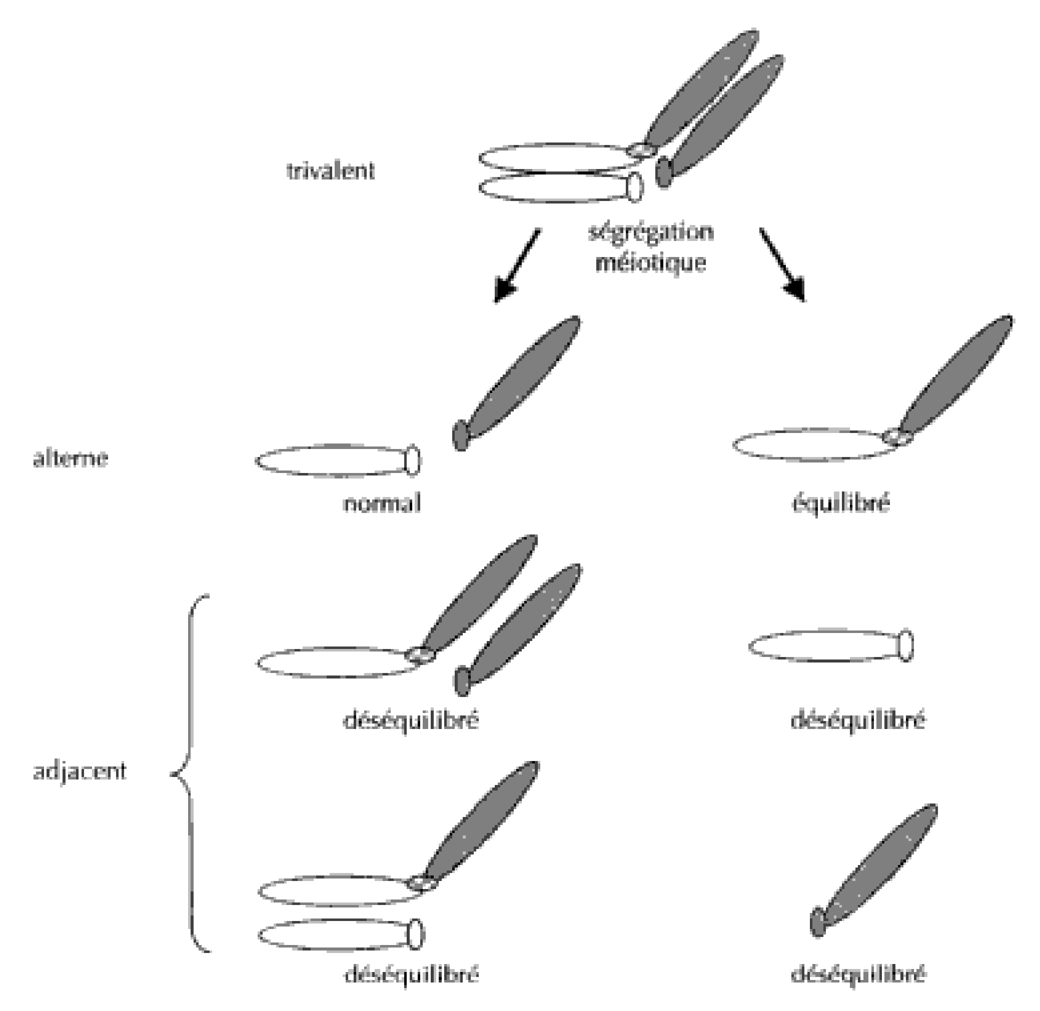
### b) Translocations Robertsoniennes

Elles correspondent à la fusion de deux chromosomes acrocentriques (13, 14, 15, 21, 22) au niveau ou à proximité des centromères. Si la fusion se produit au niveau des bras courts, le chromosome transloqué est dicentrique, possédant deux centromères. L'un des deux centromères est généralement inactivé, permettant au chromosome remanié de se comporter comme un chromosome monocentrique. Le chromosome remanié comporte dans tous les cas les bras longs des deux chromosomes acrocentriques concernés, alors que les bras courts sont généralement perdus.

Le caryotype est pourtant dit « équilibré », parce que la perte des bras courts de deux chromosomes acrocentriques est sans retentissement sur le phénotype. En effet, les bras courts des cinq paires de chromosomes acrocentriques possédant de multiples copies des gènes codant pour l'ARN ribosomal, la perte des bras courts de deux chromosomes acrocentriques est sans conséquence. Le caryotype d'un individu porteur de la translocation équilibrée comporte 45 chromosomes. Les translocations Robertsoniennes représentent les anomalies chromosomiques de structure les plus fréquentes dans la population humaine (1/1 000 naissances). Toutes les combinaisons entre acrocentriques ne sont pas aussi fréquentes. La plus fréquente est la translocation (13;14).

Ce type de translocation est en général sans effet sur le phénotype, mais il expose à la constitution de gamètes déséquilibrés, pouvant être responsables en particulier de trisomies 13 ou 21 si la translocation Robertsonienne concerne l'un de ces chromosomes. En méiose, le chromosome transloqué forme avec les deux chromosomes homologues normaux un trivalent (*fig. 13*). Cet appariement méiotique peut conduire à un déséquilibre de ségrégation ou à un trouble de la spermatogenèse. Le risque chromosomique dépend d'une part des chromosomes acrocentriques impliqués et d'autre part du sexe du parent porteur de la translocation. Par exemple, dans le cas d'une translocation (14;21), le risque de trisomie 21 dans la descendance est de 15 % si c'est la mère qui est porteuse de la translocation et de 2,5 % si c'est le père qui en est porteur. Dans le cas d'une translocation (21;21) chez l'un des parents, le risque de trisomie 21 dans la descendance est de 100 %. Il existe donc un risque de récurrence de trisomie lorsque l'un des parents est porteur d'une translocation robertsonienne.

Une autre conséquence possible des translocations Robertsoniennes est la disomie uniparentale. La disomie uniparentale correspond à la présence chez un individu de chromosomes homologues provenant du même parent avec absence de contribution de l'autre parent pour le chromosome impliqué. Des anomalies du phénotype ont été décrites dans les disomies parentales des chromosomes 14 et 15.




Appariement de la translocation Robertsonienne et des chromosomes homologues sous la forme d'un trivalent. La ségrégation en méiose I produit des gamètes équilibrés (mode alterne) ou des gamètes déséquilibrés (mode adjacent). Les gamètes déséquilibrés sont à l'origine de zygotes trisomiques ou monosomiques des chromosomes impliqués dans la translocation.

**Figure 13.** Ségrégation méiotique des translocations Robertsoniennes

## 2. Délétions

Elles correspondent à la perte d'un segment chromosomique. Les délétions peuvent être terminales ou interstitielles. Elles entraînent une monosomie partielle pour le segment chromosomique délété. Différents mécanismes peuvent être à l'origine d'une délétion. Il peut s'agir de cassure chromosomique, d'une recombinaison inégale au cours de la méiose entre chromosomes homologues ou du résultat de la malségrégation d'une translocation réciproque. Les délétions surviennent le plus souvent *de novo*. Seulement 10 à 15 % des délétions proviennent de la malségrégation d'un remaniement parental équilibré. Dans ce dernier cas, la délétion peut être pure, ou associée à une trisomie partielle pour un autre chromosome.
Le retentissement sur le phénotype dépend de la taille du segment délété et de son contenu génique. Sur un autosome, le retentissement phénotypique est souvent important. L'emploi des techniques de bandes en haute résolution a permis de décrire un certain nombre de microdélétions chromosomiques associées à des syndromes particuliers. Les phénotypes de ces syndromes sont dus à la perte d'un ou plusieurs gènes à expression soit autosomique dominante, soit récessive, ou bien liée à l'empreinte génomique. Si le gène est à expression autosomique dominante,

la perte du gène sur l'autosome délété entraîne l'expression du phénotype. Par exemple, la délétion 11p13 emporte le gène PAX-6 dont l'hémizygotie est responsable de l'aniridie (absence d'iris). Le gène délété est dose sensible, de sorte que l'haploinsuffisance survient parce que 50 % de l'activité provient exclusivement de la copie du gène restant. Si le gène est à expression autosomique récessive, le trait phénotypique apparaît lorsque le gène est délété sur un des autosomes et muté sur l'autosome homologue. Par exemple, la tumeur de Wilms n'apparaît que si une mutation somatique sur l'autosome homologue est associée à la délétion 11p13. La délétion du gène démasque un allèle récessif au niveau de la copie du gène restant. Si le gène est soumis à l'empreinte génomique, le phénotype apparaît lorsque le gène est délété sur un chromosome et non exprimé car soumis à l'empreinte sur le chromosome homologue. Les signes cliniques sont dus à la délétion de la copie fonctionnelle d'un gène soumis à empreinte génomique. Cela est observé pour les délétions de la région chromosomique 15q11-q12 dans les syndromes de Prader-Willi et d'Angelman. La microdélétion chromosomique est observée sur le chromosome d'origine paternelle dans le syndrome de Prader-Willi et sur le chromosome d'origine maternelle dans le syndrome d'Angelman. Ainsi, bien que ces deux syndromes soient associés à une délétion de la même région chromosomique, les phénotypes (retard mental, troubles du comportement, dysmorphie) diffèrent.

Les patients avec une microdélétion chromosomique présentent souvent des signes cliniques caractéristiques, bien qu'il puisse exister des variabilités cliniques entre les individus atteints.

En cancérologie, une délétion acquise peut être responsable de la perte d'un gène suppresseur de tumeur et entraîner une prolifération tumorale, comme dans le rétinoblastome.

Les microdélétions peuvent être observées par l'analyse chromosomique en haute résolution. Cependant, certaines délétions ne peuvent être visualisées par ces techniques et nécessitent l'utilisation de la cytogénétique moléculaire avec des sondes d'ADN. Les techniques d'hybridation *in situ* permettent de caractériser les microdélétions avec des sondes d'ADN spécifiques de la région chromosomique impliquée dans le syndrome. L'existence d'une microdélétion chromosomique se traduira par l'absence d'un signal d'hybridation sur l'un des chromosomes homologues. Ces techniques ont remplacé les techniques de haute résolution. Le choix de la technique dépend aussi de l'anomalie. Une délétion sera recherchée par hybridation *in situ* et une disomie parentale sera caractérisée par l'utilisation de marqueurs polymorphes par PCR.

## 3. Chromosomes en anneau

Ils correspondent à des délétions plus ou moins étendues au niveau des deux extrémités d'un chromosome suivi d'un recollement du segment intermédiaire aboutissant à la formation d'une structure annulaire. Il en résulte une monosomie partielle pour les segments délétés. Les chromosomes en anneau sont des anomalies chromosomiques rares mais ils ont été observés pour tous les chromosomes humains. Les chromosomes en anneau sont des structures instables au cours des mitoses, entraînant la formation de cellules sans chromosome en anneau ou avec plusieurs chromosomes en anneau.

## 4. Inversions

Les inversions correspondent à une rotation de 180° d'un segment chromosomique au niveau d'un chromosome. Leur fréquence est de 0,1 à 0,3/1 000. Une inversion nécessite pour se produire deux points de cassure au niveau du chromosome. Les inversions peuvent être paracentriques lorsque les points de cassure sont situés sur le même bras du chromosome, ou péricentriques lorsque les points de cassure sont situés de part et d'autre du centromère et impliquent donc les deux bras du chromosome.
Les inversions équilibrées, comme dans le cas des translocations, sont en général sans effet sur le phénotype, mais comportent des risques d'anomalies chromosomiques pour la descendance. Pour satisfaire aux contraintes d'appariement des segments inversés et des segments non inversés, le chromosome inversé et son homologue forment en prophase de méiose I une image en boucle. Les inversions peuvent se déséquilibrer par un mécanisme méiotique particulier, l'aneusomie de recombinaison, dû à une recombinaison se produisant dans le segment chromosomique inversé. S'il n'y a pas de recombinaison à la méiose dans le segment inversé, la moitié des gamètes comportera le chromosome inversé et l'autre moitié le chromosome homologue normal. S'il se produit une recombinaison dans le segment chromosomique inversé, les chromosomes recombinés comporteront soit une duplication, soit une délétion.

### a) Inversion paracentrique

Les inversions paracentriques les plus fréquemment observées sont les inversions paracentriques des chromosomes 1, 3, 5, 7, 11 et 14. Les sujets porteurs d'une inversion paracentrique ont peu de risque pour leur descendance. En méiose, les segments homologues des deux chromosomes homologues s'apparient et forment une boucle d'inversion. Leur descendance vivante est pratiquement pour moitié de sujets à caryotype normal et pour l'autre moitié de sujets porteurs de l'anomalie équilibrée. Dans les inversions paracentriques, les aneusomies de recombinaison aboutissent à un bouleversement très important de l'architecture chromosomique (chromosome dicentrique ou chromosome acentrique) et les déséquilibres obtenus sont généralement non viables.
Le mode de dépistage des inversions paracentriques est le plus souvent fortuit ou par ordre décroissant de fréquence, le fait de fausses-couches, d'enfants handicapés ou d'infertilité.

### b) Inversion péricentrique

Certaines inversions péricentriques sont très fréquentes. L'inversion du chromosome 2 [inv(2)(p12q14)] est l'inversion la plus souvent observée en France, liée à la population juive originaire d'Afrique du Nord. De même, l'inversion péricentrique du chromosome 9 [inv(9)(p11q13)] existe chez un individu sur quatre cents environ, avec de grandes variations géographiques. L'inversion du chromosome Y [inv(Y)] existe chez un à 2/1 000 hommes.
Dans les inversions péricentriques, les aneusomies de recombinaison à la méiose aboutissent à la duplication de l'un des segments non inversé et à une délétion de l'autre responsable d'une duplication-déficience soit viable (handicap à la naissance), soit létale (fausse-couche).

## 5. Isochromosome

Les isochromosomes correspondent à des chromosomes comportant deux bras identiques. Il existe donc une perte d'un bras entier d'un chromosome et une duplication de l'autre bras. Il en résulte une monosomie pour le bras perdu et une trisomie pour le bras dupliqué.
L'isochromosome le plus fréquemment observé dans l'espèce humaine est l'isochromosome du bras long du chromosome X [i(Xq)] responsable d'un syndrome de Turner. D'autres isochromosomes ont été décrits, comme l'isochromosome du bras court du chromosome 12 [i(12p)] responsable du syndrome de Pallister-Killian.
Les isochromosomes sont aussi fréquents dans les tumeurs solides et les leucémies, comme l'isochromosome du bras long du chromosome 17 [i(17q)] dans la leucémie myéloïde chronique.
Il existe plusieurs mécanismes possibles de formation d'un isochromosome. Il peut s'agir d'une cassure-délétion de deux chromatides sœurs dans une région péricentromérique avec recollement en U, ou bien d'une translocation d'un bras chromosomique sur la chromatide sœur ou le chromosome homologue au niveau de la région péricentromérique.

## 6. Insertion

Une insertion correspond à la cassure d'un fragment chromosomique, avec recollement des régions flanquantes et translocation du fragment chromosomique à un autre endroit, soit sur le même chromosome, soit sur un autre. Une insertion est directe si le fragment conserve son orientation par rapport au centromère. Elle est inversée si la bande la plus proximale du fragment se retrouve la plus éloignée du centromère. Cette anomalie chromosomique peut rester équilibrée et stable dans les cellules somatiques au cours des générations cellulaires. Elle est cependant très instable en méiose.

## 7. Duplication

Une duplication correspond à un dédoublement d'un segment chromosomique. Les duplications peuvent résulter d'une recombinaison inégale au cours de la méiose. Elles peuvent se produire en tandem ou de façon inversée. En tandem, le fragment dupliqué conserve la même orientation que le fragment original. De façon inversée, il prend une orientation inverse du fragment original. Les duplications sont responsables de trisomie partielle pour la région chromosomique dupliquée. Le phénotype est dépendant de la taille et du contenu génique du segment chromosomique dupliqué.

## 8. Chromosome dicentrique

Un chromosome dicentrique est un chromosome possédant deux centromères. Le mécanisme de formation peut être dû à la fusion de deux chromosomes ou de deux chromatides sœurs au niveau de leurs extrémités.

## 9. Remaniements chromosomiques complexes

Les remaniements chromosomiques complexes sont des anomalies chromosomiques impliquant plus de deux chromosomes et/ou plus de trois points de cassures.

Ces anomalies chromosomiques se rencontrent fréquemment dans de nombreuses tumeurs solides et lymphomes.

### 10. Marqueur

Les chromosomes marqueurs sont des petits fragments chromosomiques non identifiables par les techniques de marquage en bandes. Ils sont habituellement surnuméraires au complément chromosomique normal.
Ils peuvent être avec ou sans retentissement phénotypique, posant des problèmes importants de conseil génétique en diagnostic prénatal. Ils peuvent dériver de n'importe quel chromosome, mais ont pour origine les régions centromériques des chromosomes acrocentriques le plus souvent en cytogénétique constitutionnelle.
Ils sont fréquents et de taille variable dans les processus cancéreux. Les études par FISH ont montré qu'ils correspondaient souvent à des remaniements chromosomiques complexes dans les cellules tumorales.

### 11. Chromosomes double minute, HSR

Les chromosomes double minute correspondent à de très petits éléments chromosomiques supplémentaires, généralement très nombreux. Une région HSR (*homogeneously staining region*) correspond à une région de coloration homogène et de taille variable, souvent importante, présente au sein d'un ou plusieurs chromosomes. Expérimentalement, les HSR peuvent se rencontrer après une exposition chronique à certains toxiques. Les chromosomes double minute et les HSR sont associés à la présence d'une amplification génique importante. Ils sont observés au cours des processus cancéreux, en particulier dans les tumeurs solides.

## V. Sites fragiles

Les sites fragiles correspondent à des lacunes ou des cassures des chromosomes, localisées de façon non aléatoire. Les sites fragiles peuvent être induits par l'action de diverses substances et conditions de culture. Certains sites fragiles, comme le site fragile localisé en Xq27 correspondant au syndrome de l'X fragile, peuvent être associés à des anomalies phénotypiques. Cependant, de nombreux sites fragiles non associés à des anomalies du phénotype sont considérés comme des variants chromosomiques.

## VI. Polymorphisme du caryotype humain

Il existe des variations normales de la morphologie de certains chromosomes humains, qui sont qualifiées de polymorphismes pour traduire l'absence d'association à des anomalies phénotypiques. Un polymorphisme chromosomique est transmis comme un caractère mendélien codominant et peut être utilisé comme marqueur dans les études familiales. Les polymorphismes les plus fréquents chez l'homme concernent la taille des régions hétérochromatiques, en particulier des chromosomes 1, 9, 16 et Y.

## VII. Incidence des anomalies chromosomiques

La fréquence des anomalies chromosomiques dans les avortements spontanés est d'au moins 50 %. L'anomalie la plus fréquemment observée dans les avortements spontanés est la monosomie X. Les autres anomalies des chromosomes sexuels fréquentes à la naissance sont rarement observées dans les avortements spontanés. Au contraire, la trisomie 16, la plus fréquente des trisomies dans les avortements spontanés, n'est jamais observée à la naissance.

L'incidence des anomalies chromosomiques fœtales est liée à l'âge maternel qui en augmente le risque. Les risques d'avoir un enfant trisomique 21 à la naissance sont de 0,07 %, 0,1 %, 0,3 %, 1 %, et 4,5 % pour une femme âgée respectivement de 25 ans, 30 ans, 35 ans, 40 ans et 45 ans.

L'incidence des anomalies chromosomiques chez les nouveau-nés est d'environ 0,7 % et chez les enfants décédés dans la période périnatale d'environ 7 %.

L'incidence des anomalies des chromosomes sexuels est de 1/400 hommes et de 1/650 femmes. Les anomalies les plus fréquentes sont 47,XXY ; 47,XYY ; 47,XXX ; 45,X.

Les anomalies chromosomiques autosomiques les plus fréquentes sont les trisomies des chromosomes 13, 18 et 21. La trisomie 21 est l'anomalie chromosomique la plus fréquente qui atteint 1/700 nouveau-nés.

Le risque de récurrence de trisomie 21 après la naissance d'un enfant atteint est d'environ 1 %. Il est de 1,4 % pour les mères âgées de moins de 30 ans et similaire au risque lié à l'âge maternel pour les mères plus âgées.

## VIII. Indications du caryotype

En pathologie humaine, les indications du caryotype sont très nombreuses que ce soit pendant la période prénatale, à la naissance, durant l'enfance, à la puberté, chez les adultes en âge de procréer ou dans les processus cancéreux.

### A. Caryotype en période prénatale

Les analyses de cytogénétique prénatale ne peuvent être pratiquées que dans les laboratoires agréés. Les agréments sont définis par l'Agence de la biomédecine.

Au stade embryonnaire, l'analyse chromosomique est effectuée à partir de blastomères biopsiés sur un embryon de six à huit cellules au troisième jour de culture *in vitro*. L'analyse chromosomique est réalisée en interphase en utilisant des sondes chromosomiques. Les indications du diagnostic préimplantatoire cytogénétique en France correspondent au diagnostic de sexe pour les maladies génétiques liées à l'X et l'analyse chromosomique des embryons chez les couples dont l'un des parents est porteur d'une translocation.

En période fœtale, le caryotype est effectué à partir de cellules fœtales recueillies par biopsie de villosités choriales ou choriocentèse (neuf à douze semaines d'amé-

norrhée), par ponction de liquide amniotique ou amniocentèse (à partir de treize semaines d'aménorrhée) ou par prélèvement de sang fœtal ou cordocentèse (à partir de 18 semaines d'aménorrhée).
Plusieurs populations de femmes enceintes à risque d'avoir un fœtus atteint d'une anomalie chromosomique ont été définies. Ainsi, un caryotype fœtal est indiqué et pris en charge par la Sécurité sociale lorsqu'il existe :

- un remaniement chromosomique équilibré chez l'un des parents ;
- une anomalie chromosomique dans la fratrie ;
- une maladie génétique liée à l'X ;
- un antécédent de grossesse(s) avec anomalie chromosomique ;
- un signe d'appel échographique (malformations fœtales, retard de croissance intra-utérin, anomalies du volume de liquide amniotique) ;
- un risque de trisomie 21 lié aux marqueurs sériques (βHCG) supérieur à 1/250 ;
- un âge maternel supérieur ou égal à 38 ans.

## B. Caryotype en période postnatale

Les anomalies chromosomiques sont responsables d'un grand nombre de maladies génétiques constitutionnelles et sont impliquées dans les causes de malformations, des retards mentaux et des échecs de reproduction. Un caryotype peut être indiqué à différents moments de la vie lors :

- du bilan d'un retard de croissance, d'un syndrome polymalformatif et/ou d'une dysmorphie chez un enfant ;
- d'une ambiguïté sexuelle ;
- d'une anomalie du développement pubertaire ;
- du bilan d'un retard mental, de troubles du comportement ou d'un retard des acquisitions ;
- d'une étude familiale d'un patient présentant un remaniement chromosomique pour déterminer son caractère hérité ou *de novo* ;
- d'un bilan d'hypofertilité, de fausses-couches à répétition.

Pour toutes ces indications, le caryotype est le plus souvent réalisé à partir de sang périphérique prélevé sur tube hépariné. Il peut également être réalisé à partir de fibroblastes prélevés par biopsie de peau.

- dans le bilan étiologique des morts fœtales *in utero*. Le caryotype est réalisé soit à partir d'un prélèvement de placenta, soit à partir de biopsie de tissu fœtal.

## C. Recherche d'anomalie chromosomique acquise

Un caryotype peut être réalisé dans les processus cancéreux (cancers, leucémies) ou après exposition à des agents chimiques ou radiations ionisantes.
Depuis la découverte du chromosome Philadelphie en 1960, dû à une translocation acquise (9;22) qui caractérise la leucémie myéloïde chronique, des anomalies cytogénétiques non aléatoires ont été découvertes dans la plupart des hémopathies malignes. L'étude du caryotype des cellules malignes dans les leucémies après ponction de moelle osseuse présente un intérêt diagnostic et pronostique.

## L'essentiel de la question

Le caryotype permet de mettre en évidence des anomalies chromosomiques de nombre ou de structure.
Le caryotype standard peut être réalisé à partir de n'importe quelle cellule nucléée en division. L'utilisation des techniques de cytogénétique moléculaire avec des sondes chromosomiques permet l'analyse des chromosomes dans les cellules quel que soit le stade du cycle cellulaire. Ces techniques permettent de mettre en évidence des remaniements chromosomiques non visibles en cytogénétique classique.
Le caryotype normal dans l'espèce humaine comporte 46 chromosomes, dont 22 paires d'autosomes et une paire de gonosomes (X,Y). La formule chromosomique s'écrit respectivement chez la femme et chez l'homme 46,XX et 46,XY.
Les anomalies chromosomiques peuvent être constitutionnelles ou acquises, homogènes ou en mosaïque.
La trisomie 21 et les anomalies de nombre des gonosomes sont les seules anomalies de nombre des chromosomes viables à long terme.
Les translocations sont les anomalies de structure des chromosomes les plus fréquentes.
Les indications du caryotype relèvent à la fois de la pédiatrie, de l'obstétrique, de l'endocrinologie, de la gynécologie, de l'assistance médicale à la procréation, de la fœtopathologie, de l'hématologie et de la cancérologie.
Les anomalies chromosomiques sont responsables de troubles de la fertilité, d'un nombre important d'avortements précoces, de morts fœtales et néonatales, de malformations congénitales, de retards mentaux, d'anomalies de la croissance et de la différenciation sexuelle, de leucémies et de cancers.

***Pour en savoir plus***


- Dutrillaux B., Couturier J. *La Pratique de l'analyse chromosomique*. Paris, Masson, 1981.
- Thompson M., Mc Innes R., Willard H. *Génétique médicale*. Paris, Flammarion, 1995.
- Feingold J., Fellous M., Solignac M. *Principes de génétique humaine*. Paris, Hermann, 1998.
- Lyonnet S., Munnich A. *Génétique pédiatrique*. Paris, Doin, 1998.
- Tachdjian G. Apport de la cytogénétique moléculaire pour le diagnostic des anomalies chromosomiques. *Presse médicale*, 1999 ; 28 : 40-3.

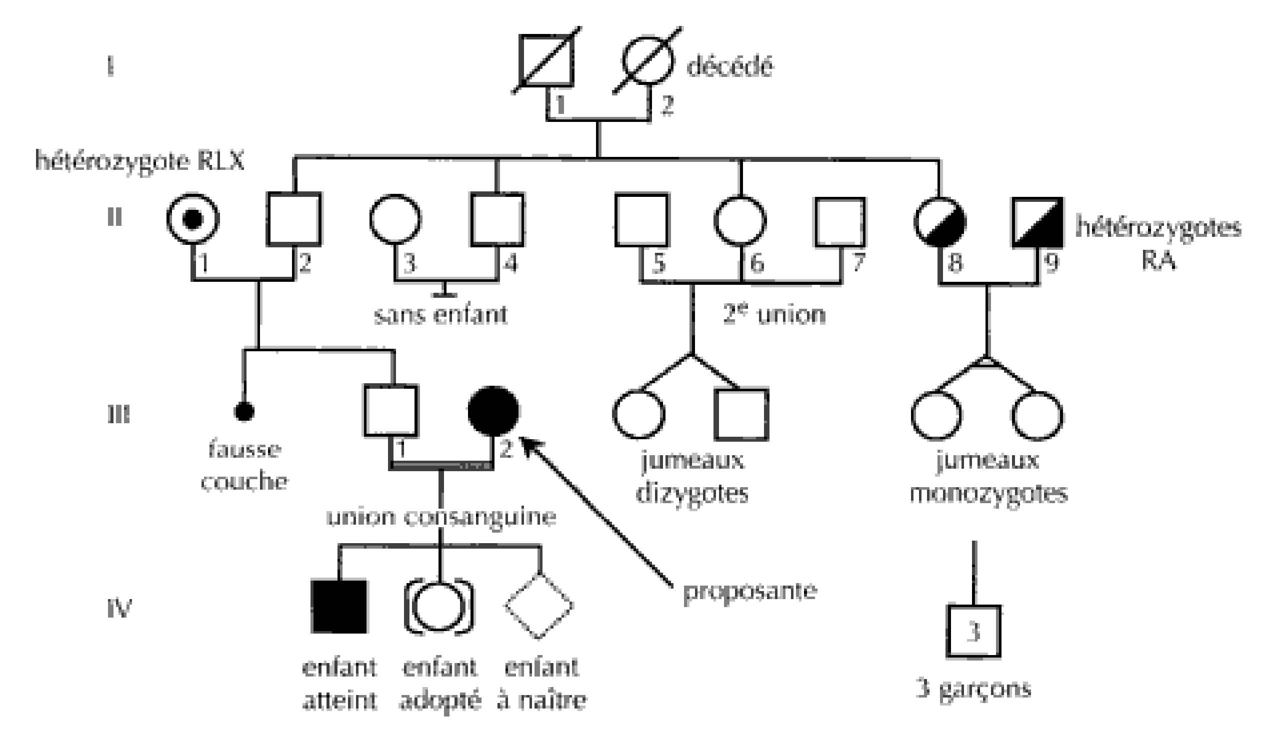
# Maladies héréditaires monofactorielles : modes de transmission et mécanismes

B. PARFAIT, D. VIDAUD
Inserm U745, Génétique et biothérapie des maladies dégénératives et prolifératives du système nerveux, Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques, Université René-Descartes, Paris.

# I. Modes de transmission des maladies héréditaires monofactorielles

## A. Arbre généalogique

Le mode de transmission d'une maladie se déduit de la répartition des sujets sains et atteints au sein d'une même famille. L'arbre généalogique résume cette information, qui doit être la plus précise possible. Les arbres généalogiques sont tracés en utilisant différents symboles reproduits en *figure 1*.




Les différentes générations sont numérotées en chiffres romains. Les différents individus d'une génération sont numérotés en chiffres arabes. Les symboles noirs ■ et ● indiquent respectivement les sujets masculins et féminins porteurs de la maladie. Une flèche (↗) désigne le proposant (*propositus*, cas index) ayant permis le recensement de la famille. Dans le cas des maladies récessives autosomiques (RA), les sujets hétérozygotes sont symbolisés ◪ ou ◕.

**Figure 1.** Symboles utilisés pour la constitution des arbres généalogiques

## B. Hérédité récessive autosomique

C'est un mode d'hérédité liée aux chromosomes non sexuels (autosomes). Seuls les sujets possédant les deux allèles mutés d'un même gène sont malades. Les sujets malades peuvent présenter deux mutations identiques sur les deux allèles du gène et sont homozygotes pour le gène morbide. Ils sont également très souvent porteurs de deux mutations différentes du même gène et sont qualifiés d'hétérozygotes composites.

## 1. Mode de transmission

La transmission de la maladie présente un aspect horizontal (*fig.* 2). Le sujet malade est homozygote ou hétérozygote composite pour le gène morbide. Ses parents sont tous deux hétérozygotes pour le gène morbide et ont un phénotype normal. Il n'existe pas de prépondérance d'un sexe chez les sujets atteints. Lors de l'union de deux hétérozygotes pour le gène morbide, un sujet sur quatre est malade, un sujet sur deux est hétérozygote et présente un phénotype normal, un sujet sur quatre ne présente aucune mutation (répartition 1/4, 1/2, 1/4). La descendance d'un sujet malade présentera un phénotype normal, sauf en cas d'union avec un sujet homozygote malade (100 % de la descendance malade) ou avec un sujet hétérozygote (50 % de la descendance malade).

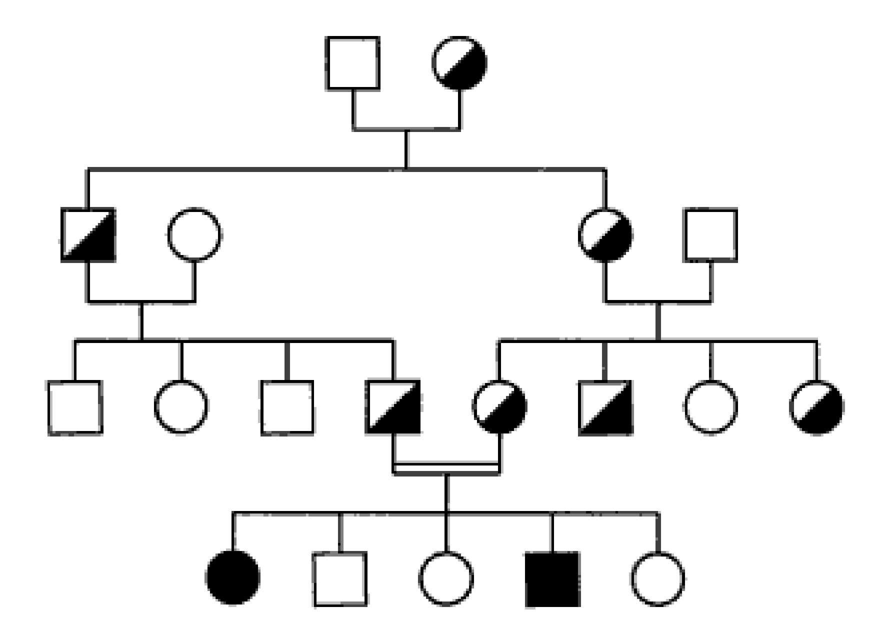


**Figure 2.** Exemple de transmission récessive autosomique

## 2. Fréquence des génotypes, loi de Hardy Weinberg

La loi de Hardy Weinberg donne la fréquence des génotypes homozygotes ou hétérozygotes en fonction de la fréquence des allèles sain (A) ou muté (a) d'un gène. Cette loi n'est applicable que si les mariages ont lieu au hasard (panmixie).

$p$ = fréquence de l'allèle A
$q$ = fréquence de l'allèle morbide a
$f(AA) = p^2$ = fréquence des homozygotes pour A
$f(aa) = q^2$ = fréquence des homozygotes pour a
$f(Aa) = 2pq$ = fréquence des hétérozygotes Aa
$p + q = 1$

Si la fréquence de la maladie dans la population est connue, il est possible d'en déduire la fréquence de l'allèle morbide q.

*Exemple* : la mucoviscidose touche 1 naissance sur 2 500.

$q^2 = 1/2\,500 \rightarrow$ q = fréquence de l'allèle morbide = $\sqrt{1/2\,500}$.
$q = 1/50$

La fréquence des hétérozygotes dans cette population est donc $2pq = 2q = 1/25$ car $p = 1 - q$ #1 (car q est faible)

Un individu sur 25 est donc porteur du gène morbide à l'état hétérozygote.
Deux phénomènes tendent à modifier la fréquence des génotypes : la sélection (maladie incompatible avec la reproduction) et les mariages non panmictiques (consanguinité et homogamie, c'est-à-dire le croisement entre sujets de même phénotype).
Deux sujets apparentés, c'est-à-dire ayant au moins un ancêtre commun vérifiable, sont consanguins. La consanguinité augmente la probabilité que deux conjoints soient hétérozygotes pour un même gène récessif et, par conséquent, la fréquence des homozygotes pour ce gène dans leur descendance. La consanguinité parentale pour une affection autosomique récessive est d'autant plus fréquemment retrouvée que la maladie est plus rare.

### 3. Quelques exemples de maladies récessives autosomiques

Il faut citer l'hémochromatose héréditaire touchant les populations du nord de l'Europe (fréquence de la maladie : 1/300), la mucoviscidose – particulièrement fréquente dans notre pays (1/2 500) –, le déficit en $\alpha 1$ antitrypsine (1/3 500), la drépanocytose, les thalassémies, l'amyotrophie spinale infantile (1/10 000), la phénylcétonurie (1/10 000), la maladie de Wilson (1/40 000)… La grande majorité des maladies métaboliques est également de transmission récessive autosomique.

## C. Hérédité dominante autosomique

C'est un mode d'hérédité liée aux autosomes. En génétique humaine, un caractère pathologique est dominant lorsqu'il apparaît chez les sujets hétérozygotes. Si A est l'allèle normal et a l'allèle délétère, un sujet de génotype Aa est malade et le sujet AA est sain. L'état homozygote aa est le plus souvent inconnu à cause de la rareté des mariages donnant naissance à de tels sujets ou à cause de la gravité extrême, voire létalité *in utero* de l'état homozygote. Dans quelques cas, les sujets AA et Aa ont le même phénotype, ce qui définit au sens strict le caractère dominant d'une maladie.

### 1. Mode de transmission

La transmission est verticale sans saut de génération (*fig.* 3). Le sujet atteint est, dans la plupart des cas, hétérozygote pour le gène pathologique considéré. Tout sujet atteint possède un parent atteint. Le plus souvent, le sujet atteint est issu d'une union entre un sujet normal AA et un sujet hétérozygote atteint Aa. L'union entre deux hétérozygotes atteints est très rare.
Il n'existe pas de prépondérance d'un sexe chez les sujets atteints puisque la transmission de la maladie est indépendante du sexe. Le sujet atteint Aa transmet la maladie à un enfant sur deux pour les enfants issus de l'union la plus fréquemment rencontrée (répartition 1/2, 1/2).

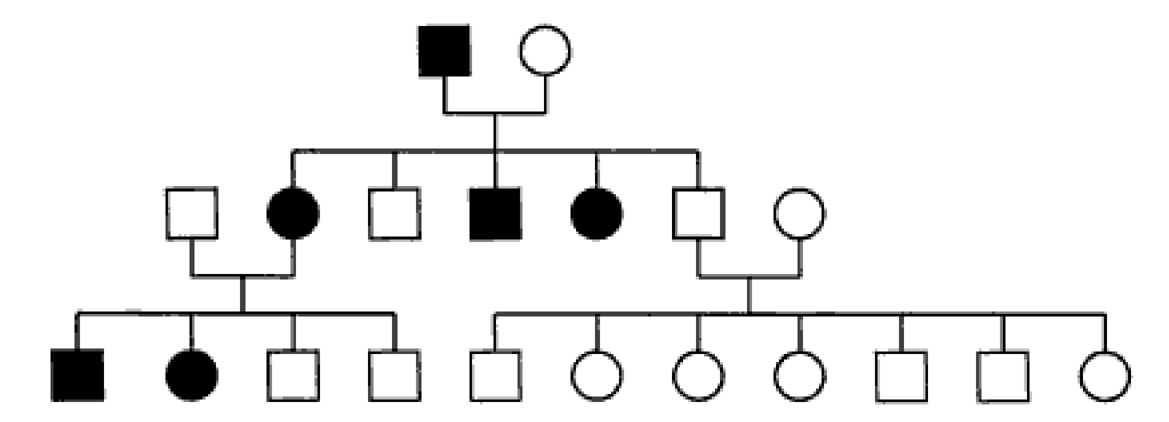


**Figure 3.** Transmission dominante autosomique

Les critères de reconnaissance d'une maladie dominante autosomique se déduisent sans difficulté de l'arbre généalogique présenté en *figure 3*. Cependant, ces règles de transmission peuvent être prises en défaut dans certaines circonstances.

## 2. Pénétrance et expressivité

La pénétrance d'un gène est le pourcentage de sujets qui, porteurs du gène, en présentent les manifestations phénotypiques. La pénétrance est définie par le rapport :

$$\frac{\text{Nombre d'hétérozygotes Aa malades}}{\text{Nombre total d'hétérozygotes Aa}} \times 100$$

Si tous les sujets porteurs d'une mutation délétère du gène morbide sont atteints, la pénétrance du gène est de 100 %. Dans certains cas, la pénétrance peut être incomplète, comme dans la polypose recto-colique (pénétrance = 80 %).

L'expressivité d'un gène est la manière dont celui-ci se manifeste dans le phénotype lorsqu'il s'exprime. Cette expressivité dépend de facteurs propres à l'individu (« fond génétique ») et de l'influence du milieu environnemental. Les principaux facteurs qui modulent l'expressivité sont l'âge, le sexe, le sexe du parent transmetteur, les interactions géniques (gènes modificateurs).

Pénétrance incomplète et expressivité variables expliquent que, dans certaines situations d'hérédité dominante autosomique, un sujet sain puisse engendrer des enfants malades ou que des sujets d'une même famille soient touchés d'une manière plus ou moins sévère.

On peut rapprocher le phénomène de pénétrance incomplète ou d'expressivité variable de celui de l'anticipation. Il y a anticipation si l'âge d'apparition d'une maladie dominante est de plus en plus précoce au cours des générations successives, ce qui s'accompagne habituellement d'une accentuation de la gravité de la maladie, comme dans le cas de la dystrophie myotonique de Steinert. Il s'agit de la maladie musculaire la plus fréquente de l'adulte puisqu'elle touche 1/7 000 sujet. C'est une affection caractérisée par une expressivité variable quant à l'âge de survenue des premiers signes cliniques, la rapidité d'évolution et le type de système impliqué. Allant d'une simple cataracte ou d'une calvitie à des anomalies musculaires (myotonie, amyotrophie) progressivement détériorantes, associées à une atteinte cardiaque, des troubles du comportement et des troubles endocriniens

avec atteinte gonadique et stérilité, cette maladie peut survenir très précocement chez le nouveau-né. Cette forme dite « néonatale » est caractérisée par une hypotonie sévère généralisée avec détresse respiratoire, des malformations articulaires. Cette maladie fait partie de l'ensemble des maladies dues à une expansion de triplets (voir « *Expansion des triplets* »).

### 3. Néomutations

Il peut arriver qu'un sujet atteint d'une maladie dominante autosomique naisse de parents indemnes. Il s'agit alors d'une néomutation dans une cellule germinale d'un des deux parents. Le cas le plus fréquent est rencontré dans l'achondroplasie. Il s'agit d'un nanisme dysharmonieux avec intelligence et fonctions gonadiques tout à fait normales. La mutation responsable de 99 % des achondroplasies a été identifiée dans le gène *FGFR3* sur le chromosome 4pter. Il s'agit d'une mutation ponctuelle entraînant le changement glycine-arginine en position 380 de la protéine. La fréquence de cette maladie est estimée à 1/15 000, la pénétrance est complète. Dans neuf cas sur dix, il s'agit d'une néomutation. Dans la descendance du sujet porteur du gène muté, on retrouve les critères de reconnaissance d'une maladie autosomique dominante.

### 4. Quelques exemples de maladies dominantes autosomiques

Il faut citer l'hypercholestérolémie familiale (1/500), la neurofibromatose de type I (1/5 000), la dystrophie myotonique de Steinert (1/7 000), la maladie de Huntington (1/10 000), l'ostéogenèse imparfaite (1/10 000)…

## D. Hérédité récessive liée au chromosome X

L'hérédité liée au chromosome X est déterminée par un gène porté par le chromosome X. Elle est dite récessive lorsque le gène morbide ne s'exprime pas à l'état hétérozygote chez la femme. Le caractère récessif lié à l'X s'exprime toujours chez l'homme hémizygote mais ne s'exprime en théorie qu'à l'état homozygote chez la femme, ce qui correspond à une situation rare. Dans quelques cas, les femmes conductrices peuvent exprimer des signes cliniques et biologiques de la maladie récessive liée à l'X. Ceci tient vraisemblablement au fait que l'inactivation clonale au hasard de l'un des deux chromosomes X chez la femme (théorie de Mary Lyon, 1949) s'exercerait principalement vis-à-vis de l'X sain chez ces femmes.

### 1. Règles de transmission

Les maladies récessives liées aux chromosomes X touchent les hommes et sont transmises par les femmes conductrices (hétérozygotes) apparemment saines (*fig.* 4). Les gènes impliqués dans les maladies RLX sont localisés sur le chromosome X. Les sujets atteints sont le plus souvent des garçons (hémizygotes). Les femmes hétérozygotes sont habituellement asymptomatiques. Cependant, certaines peuvent exprimer la maladie avec une sévérité variable (inactivation du chromosome X). Toutes les filles d'un homme atteint sont vectrices de la maladie alors

que tous les garçons sont sains (la transmission père-fils n'existe pas). Le fils d'une femme hétérozygote présente un risque de 50 % d'hériter de la maladie.

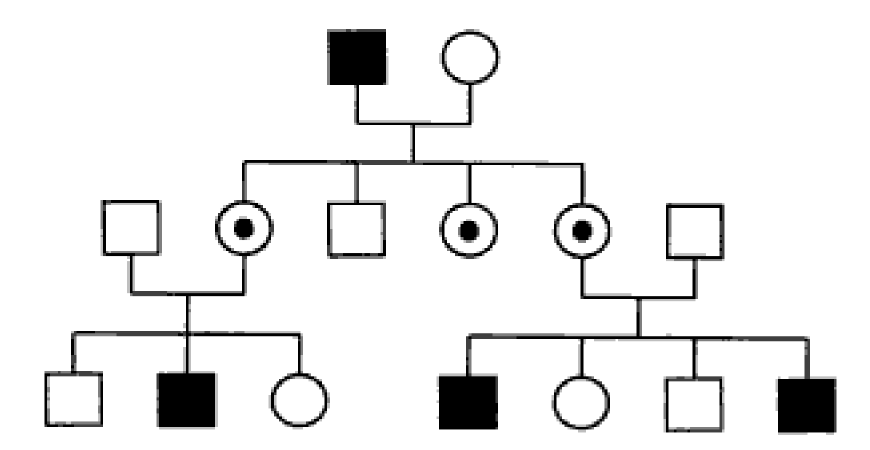


**Figure 4.** Arbre généalogique d'une maladie récessive liée au sexe : maladie de Hunter, due à un déficit en αL-induronate sulfatase. Les femmes conductrices sont représentées par le symbole ⊙

## 2. Néomutations

Il existe un taux élevé de néomutations pour certains gènes portés par le chromosome X (myopathie de Duchenne, hémophilie A), rendant ainsi la maladie accidentelle. Cependant, il faut considérer la maladie comme héréditaire pour la descendance du sujet atteint.
L'analyse de l'arbre généalogique permet de distinguer les vectrices obligatoires et les vectrices potentielles.
Vectrice obligatoire :
- fille d'un père malade ;
- mère d'un seul garçon malade avec antécédents familiaux.

Vectrice potentielle :
- mère d'un garçon malade sans antécédents familiaux ;
- femme ayant des antécédents familiaux mais n'ayant pas encore donné naissance à un garçon malade.

## 3. Quelques exemples de maladies récessives liées à l'X

Il faut citer la myopathie de Duchenne de Boulogne (1/3 500 garçons), les différentes formes d'hémophilies (hémophilie A [1/5 000 garçons], hémophilie B), le déficit en G6PDH, l'adrénoleucodystrophie (1/20 000 garçons)…

# E. Hérédité dominante liée au chromosome X

Il s'agit d'un mode de transmission plus rare que ceux précédemment décrits. L'hérédité liée à l'X est dite « dominante » lorsque le gène morbide s'exprime à l'état hétérozygote comme à l'état homozygote chez la femme, ou hémizygote chez l'homme.
La transmission se fait de manière verticale. Si la transmission de la maladie est effectuée par le père, toutes les filles seront atteintes et tous les garçons seront

sains : il n'y a jamais de transmission père-fils (caractère distinctif vis-à-vis de la transmission dominante autosomique). Si le transmetteur est la mère, un enfant sur deux sera atteint, quel que soit le sexe.
Les affections dominantes liées à l'X s'expriment habituellement de façon plus sévère chez le garçon que chez la fille. Certaines sont létales chez le garçon *in utero*, comme dans l'*incontinentia pigmenti*, et ne paraissent donc exister que chez la fille (*fig.* 5).

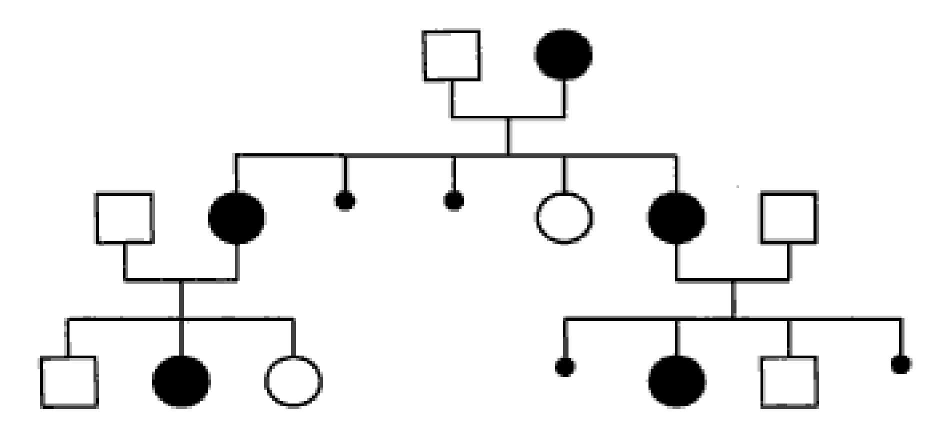


**Figure 5.** Arbre généalogique d'une maladie dominante liée à l'X : l'*incontinentia pigmenti*. La maladie est létale chez le fœtus mâle mais compatible avec la vie et la reproduction chez les sujets de sexe féminin

Comme dans les maladies dominantes autosomiques, la pénétrance peut être incomplète et l'expressivité variable. C'est le cas du syndrome de l'X fragile (1/1 500 naissances de garçons, 1/2 500 naissances de filles) dont la pénétrance est de 80 % chez le garçon et 30 % seulement chez la fille.

## F. Hérédité liée au chromosome Y (ou hérédité holandrique)

Un caractère lié au chromosome Y se transmet d'un sujet de sexe masculin à tous ses fils, ces derniers ayant reçu le même chromosome Y de leur père. Mais on ne connaît pas de caractères pathologiques à transmission holandrique. En effet, le chromosome Y possède des gènes dont le produit de l'expression est impliqué dans la différenciation sexuelle et toute mutation délétère à leur niveau entraîne une stérilité masculine (les mutations du gène SRY sont les mieux connues).

## G. Hérédité mitochondriale

La majorité des polypeptides de la chaîne respiratoire est codée par le génome nucléaire, synthétisée dans le cytoplasme et importée dans la mitochondrie. En revanche, treize d'entre eux sont codés par le génome mitochondrial. Cet ADN mitochondrial (ADNmt) est localisé dans la matrice mitochondriale et comporte également 22 ARNt et 2 ARNr, éléments nécessaires pour sa propre traduction.

### 1. Règles de transmission

Chez l'homme, l'ADNmt est transmis selon le mode maternel. Seules les mitochondries de l'ovocyte sont transmises, celles du spermatozoïde ne pénètrent pas dans

l'œuf ou sont dégradées durant la fécondation. Ainsi, les mères transmettent leur ADNmt à tous leurs enfants. Les filles à leur tour transmettent leur ADNmt à la génération suivante. En revanche, les hommes ne transmettent jamais leur ADNmt (*fig. 6*).
Chaque cellule humaine possède de nombreuses mitochondries et chaque mitochondrie, plusieurs copies d'ADNmt. Une même cellule, ou une même mitochondrie, peut contenir à la fois des molécules normales et des molécules mutées : on parle d'hétéroplasmie. Au cours des divisions cellulaires, les molécules normales et mutées sont distribuées au hasard dans les cellules filles (ségrégation mitotique). La proportion des deux espèces moléculaires peut donc être très variable d'une cellule à l'autre. Aussi, l'étude génétique des maladies mitochondriales est souvent déroutante car les enfants d'une même famille ne sont pas forcément tous atteints. En effet, bien que porteuse de la mutation de l'ADNmt, la proportion de molécules mutées peut varier d'un individu à l'autre, d'un tissu à l'autre, d'une cellule à l'autre, et donner lieu à des phénotypes très différents.

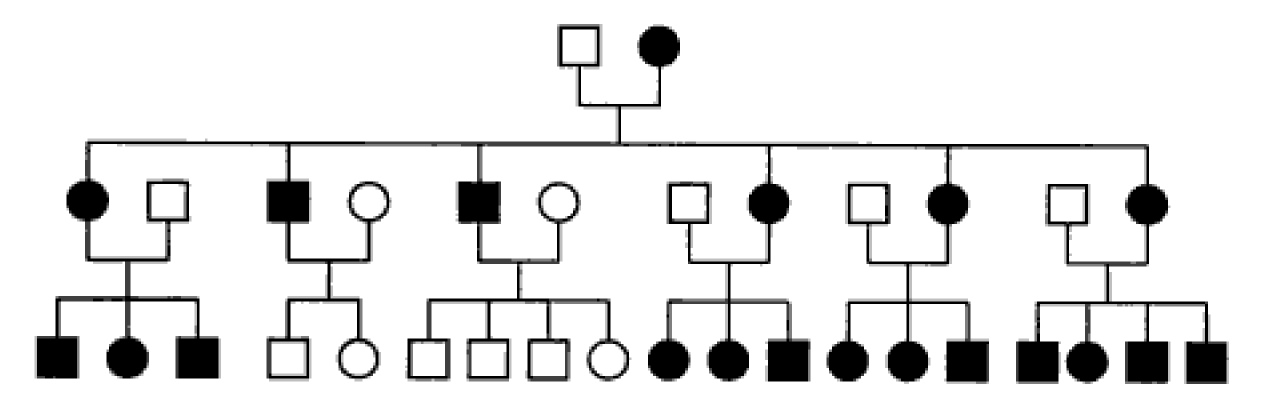


**Figure 6.** Exemple d'hérédité maternelle rencontrée dans certaines maladies mitochondriales. Les mères transmettent leur ADNmt muté à tous leurs enfants

### 2. Quelques exemples de maladies à hérédité maternelle

Des délétions, des mutations ponctuelles de l'ADNmt ont été retrouvées dans de nombreux syndromes ou associations : délétions dans le syndrome de Kearns et Sayre, de Pearson, dans des associations diabète-surdité, mutations ponctuelles dans l'atrophie optique de Leber, les syndromes NARP (*neurogenic ataxia, retinitis pigmentosa*), MERRF (*myoclonic epilepsy, ragged-red fibers*), MELAS (*mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes*)…

## II. Mécanismes de transmission des maladies héréditaires monofactorielles

Le terme de mutation désigne tout changement du matériel héréditaire survenant soit dans la lignée germinale (mutations germinales) soit dans les cellules somatiques (mutations somatiques). Seules les mutations germinales peuvent être transmises à la descendance et sont à l'origine des maladies héréditaires. Les mutations

sont dans la majorité des cas spontanées, mais elles peuvent également être induites par exposition à des agents mutagènes.
Il est possible de distinguer trois grandes classes de mutations :
- les mutations nucléotidiques par remplacement d'une base ;
- les insertions-délétions de quelques nucléotides incluant les expansions de répétitions trinucléotidiques ;
- les remaniements géniques qui regroupent les grandes délétions et insertions, duplications, inversions, conversions géniques.

## A. Différents types de mutations

### 1. Remplacement d'une base : substitution nucléotidique

On distingue les transitions (remplacement d'une base pyrimidique [C ou T] ou purique [A ou G] par une autre base de même type) des transversions (remplacement d'une base purique par une base pyrimidique ou inversement). Les transitions sont en moyenne deux fois plus fréquentes que les transversions, alors que l'inverse serait attendu si le changement de bases s'effectuait au hasard. En effet, chaque base peut théoriquement subir deux transversions et seulement une transition. L'excès de transition est probablement dû à la combinaison de propriétés des ADN polymérases (incorporations erronées plus fréquentes d'une base de même nature lors de la réplication) et de celle des systèmes de correction (une incorporation erronée de type transversion entraîne une anomalie de la double hélice beaucoup plus importante et plus efficacement reconnue par les systèmes de correction qu'une transition).
Parmi les transitions, celles concernant le dinucléotide CpG vers TpG ou CpA sont largement surreprésentées dans presque toutes les maladies génétiques. Elles rendent compte, en moyenne, d'un tiers des substitutions de bases. Le dinucléotide CpG est donc un véritable point chaud de mutation.
Pour l'hémophilie B, on a estimé que la probabilité de mutation par transition est environ 25 fois plus élevée pour un CpG que pour tout autre dinucléotide. Les dinucléotides CpG sont la cible fréquente d'une modification enzymatique physiologique de l'ADN, la méthylation. Celle-ci n'affecte en effet que la position 5' d'une cytosine au sein du dinucléotide CpG. Par ailleurs, au sein de l'ADN, la cytosine est susceptible d'être désaminée en uracile par une désaminase : la présence d'un uracile, constituant anormal de l'ADN, est détectée efficacement par un mécanisme d'excision (uracile DNA glycosylase). Si la désamination concerne la cytosine méthylée, cette dernière est transformée en thymine, erreur qui sera moins efficacement détectée (*fig. 7*). En raison du caractère palindromique du dinucléotide CpG et de sa méthylation, il en résulte une mutation vers TpG ou CpA. Certains CpG sont plus susceptibles de muter que d'autres. Ainsi, la mutation récurrente C GGA/G → C AGA/G (p.Gly380Arg dans le récepteur FGFR3), responsable de l'achondroplasie (voir « *Quelques exemples de maladies récessives autosomiques* »), survient à une fréquence de cinquante à cinq cents fois plus grande que la moyenne des autres CpG dans le génome.

5'ACpGG3' / 3'TGCpC5'

5'ACpGG3' / 3'TGCpC5' (m) — désamination → 5'ATGG3' / 3'TGCC5' — réplication → 5'ATGG3' / 3'TACC5' ; 5'ACGG3' / 3'TGCC5' — C→T

5'ACpGG3' / 3'TGCpC5' (m) — désamination → 5'ACGG3' / 3'TGTC5' — réplication → 5'ACAG3' / 3'TGTC5' ; 5'ACGG3' / 3'TGGC5' — G→A

**Figure 7.** Mécanisme d'apparition des mutations au sein du dimère CpG

## 2. Petites délétions ou insertions

Les délétions ou insertions d'un ou quelques nucléotides sont également des mutations fréquentes. Elles entraînent, en général, un décalage du cadre de lecture (*frameshift*) qui aboutit à l'apparition d'un codon STOP prématuré et à la présence d'une protéine tronquée (la plupart du temps non-fonctionnelle), sauf dans les cas de délétions ou insertions d'un ou plusieurs codons.
Elles surviennent souvent au niveau de courtes répétitions en tandem, très probablement par un mécanisme de dérapage (*slippage*) de l'ADN polymérase lors de la réplication de l'ADN.

## 3. Grandes délétions, duplications ou inversions

Les délétions de tout ou partie d'un gène sont la cause minoritaire de nombreuses maladies, mais sont particulièrement nombreuses pour certaines maladies comme la myopathie de Duchenne (60 % des cas), l'amyotrophie spinale (90 % des cas).
Le mécanisme peut être soit une recombinaison homologue entre deux séquences quasiment identiques encadrant la région cible du réarrangement et survenue lors d'un *crossing-over* méiotique inégal, soit par échange entre chromatides sœurs. Lorsque la délétion survient entre des séquences ne présentant pas d'homologie, on parle de recombinaison non homologue ou illégitime.

### a) Recombinaison homologue

Une recombinaison homologue peut entraîner soit une délétion soit une duplication en miroir. Ces recombinaisons expliquent l'existence de chromosomes comportant un seul ou trois gènes *HBA* codant l'α-globine, dérivant de chromosomes normaux comportant deux gènes *HBA* en tandem (*fig. 8*). Il existe deux régions de forte homologie, dénommées x et z, susceptibles de provoquer des délétions-duplications par *crossing-over* inégal.

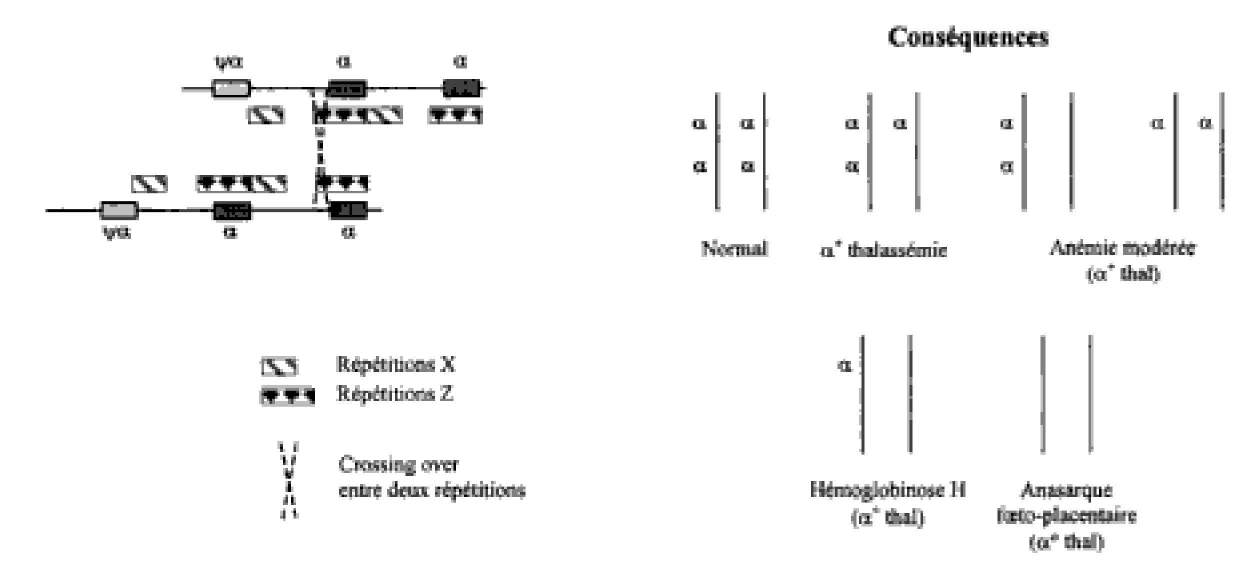



**Figure 8.** Appariement des séquences homologues x et z des gènes *HBA* codant la sous-unité α de la globine à l'origine des délétions-duplications observées dans les α-thalassémies (d'après Strachan et Read, 2003)

La présence de séquences répétées d'une trentaine de kb encadrant une région de 1.5 Mb sur le chromosome 17 est responsable d'événements de délétions ou de duplications de cette région qui contient le gène *PMP22* (codant une protéine de la myéline), à l'origine de neuropathies (maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1A, CMT1A pour la duplication et neuropathie tomaculaire, HNPP pour la délétion).

La présence de trois copies d'une séquence génique, une copie dans un intron du gène *F8* codant le facteur VIII de coagulation, les deux autres d'orientation opposée à l'extérieur du gène, est responsable d'une inversion du segment chromosomique entre deux copies de sens opposé. Cette mutation récurrente rend compte de près de la moitié des hémophilies A sévères (*fig.* 9).

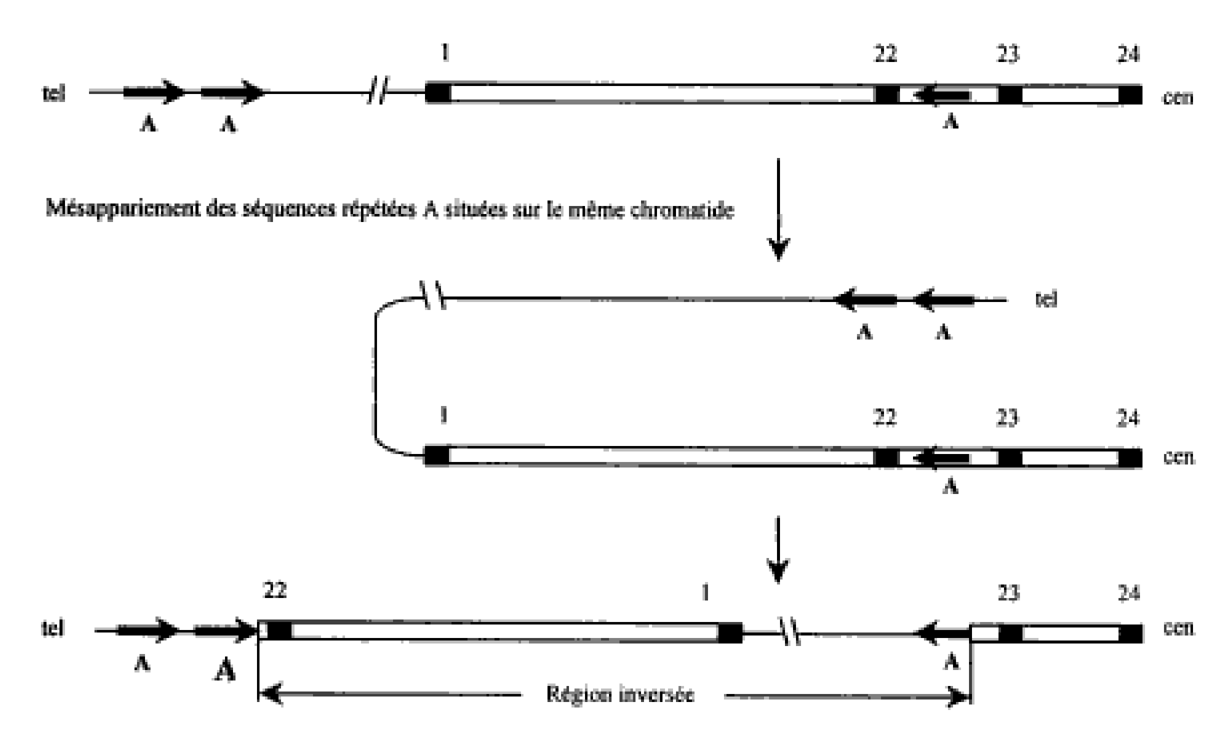
Dans certains cas, on observe un très fort biais parental pour l'origine de nouvelles mutations. Notamment, l'inversion récurrente dans l'hémophilie A et la duplication autour de *PMP22* dans la maladie de Charcot-Marie-Tooth surviennent presque exclusivement dans les cellules germinales mâles.

### b) Recombinaison illégitime

La recombinaison illégitime entre séquences non homologues paraît impliquée dans les délétions ou duplications particulièrement fréquentes du gène de la myopathie de Duchenne sans que l'on puisse actuellement expliquer l'instabilité particulière de certaines régions de ce gène.

## 4. Expansion des triplets

Depuis 1991, il a été montré qu'un type inattendu de mutations instables par expansions de triplets était responsable d'un certain nombre de maladies dont la liste n'est pas close. La plupart d'entre elles sont des maladies neurodégénératives (ex. : le retard mental avec X fragile, la dystrophie myotonique de Steinert, la chorée de Huntington).




L'appariement intrachromosomique des séquences homologues A situées à la fois dans l'intron 22 du gène *F8* et environ 400 kb en direction télomérique aboutit à une inversion de l'ensemble des 22 premiers exons du gène *F8*.
tel, vers le télomère ; cen, vers le centromère.

**Figure 9.** Inversion du gène codant le facteur VIII de la coagulation

Leur mode de transmission présente pour la plupart d'entre elles des caractéristiques très inhabituelles avec un biais de transmission parentale des formes les plus sévères avec une augmentation au cours des générations successives du risque de développer la maladie ou de la sévérité et de la précocité des manifestations cliniques (phénomène connu sous le nom d'anticipation). Les expansions de triplets peuvent survenir à différents niveaux :

- région 5' non codante du gène (CGG et X fragile) ;
- région 3' non codante (CTG et Steinert) ;
- dans un exon avec apparition de polyglutamines associées à des manifestations cliniques neurologiques (CAG dans la maladie de Huntington, le syndrome de Kennedy, les ataxies spinocérébelleuses) ;
- dans un intron (GAA et ataxie de Friedreich).

Bien que cela ne soit pas prouvé, il est généralement admis qu'au-delà d'un certain seuil de longueur (environ cinquante répétitions), les répétitions formeraient des structures anormales de type épingles à cheveux ou triple hélice, perturbant la réplication et favorisant les dérapages ou glissements réplicatifs.

## 5. Mécanismes rares (insertions, conversions géniques, anomalies chromosomiques)

### a) Insertion de séquences répétées dispersées

Le génome humain contient un grand nombre de séquences répétées dispersées, notamment les séquences courtes (300 pb) de type *Alu* (ou *SINE*), dont il existe environ 600 000 copies dans le génome, et des séquences de 3 à 7 kb (famille K*pn*,

ou *LINE*) dérivée de rétrotransposons. L'insertion de ces séquences se produit après la rétrotranscription d'ARN issu de très rares copies actives de ces éléments, mécanisme qui paraît relativement peu actif dans le génome humain actuel. En effet, parmi les milliers de mutations indépendantes caractérisées pour des maladies comme les hémophilies A et B, la mucoviscidose ou la myopathie de Duchenne, très rares sont les événements de mutation dus à de telles insertions. Lorsque ces dernières sont exoniques, elles interrompent la séquence codant une protéine. Des cas d'insertions introniques affectant l'épissage ont également été décrits. La caractérisation de néomutation due à l'insertion de séquence *LINE* dans le gène *F8* codant le facteur VIII de coagulation (hémophilie A) a permis d'identifier une copie active de cet élément, qui code une transcriptase inverse impliquée dans la transposition.

### b) Conversion génique

Lorsque des séquences très homologues sont à proximité l'une de l'autre dans le génome, un mécanisme de transfert localisé non réciproque (à la différence du *crossing-over* inégal) – identifié initialement chez la levure et appelé conversion génique – peut entraîner dans le gène « receveur » une série de changements nucléotidiques répartis sur une région assez courte. Dans certains cas, la séquence donneuse est un pseudogène, inactivé par l'accumulation de mutation, et le transfert d'une de ces mutations inactive le gène receveur.

### c) Réarrangements chromosomiques

Enfin, des réarrangements chromosomiques comme des translocations équilibrées, s'ils ont un point de cassure à l'intérieur d'un gène, inactivent ce dernier et pourront être responsables soit d'une maladie monogénique autosomique dominante (une seule copie étant inactivée), soit à l'expression chez une fille d'une maladie récessive liée à l'X (dans le cas de translocation X-autosomes). Ces mécanismes sont très rares mais importants à identifier car ils permettent de localiser très précisément, puis de cloner, le gène de la maladie en question (stratégie employée pour de nombreux gènes, de maladies liées à l'X, pour la neurofibromatose de type 1, etc.).
Les délétions de toute une région chromosomique peuvent enfin être associées à des phénotypes dits de gènes contigus, syndromes complexes (par exemple, le syndrome de Di George/vélocardiofacial = CATCH22 avec délétion en 22q11.2) ou entraîner une association de phénotypes monogéniques identifiables.

## 6. Mutations *de novo*, mosaïques germinales et mosaïques somatiques

Un petit nombre de mutations, dites « *de novo* » ou « néomutations », surviennent dans la lignée germinale, au cours des divisions mitotiques durant la spermatogenèse ou l'ovogenèse, ou pendant la méiose elle-même. Pour certaines maladies, la fréquence d'apparition de mutations *de novo* peut être très importante (33 % des cas pour la myopathie de Duchenne, l'hémophilie A, 50 % des cas pour la neurofibromatose de type I, 90 % des cas pour l'achondroplasie).
Une maladie due à une mutation *de novo* ne récidive habituellement pas dans la fratrie. Cependant, il a été décrit le cas de parents de phénotype normal ayant plus

d'un enfant atteint (neurofibromatose de type I, ostéogenèse imparfaite). Pour expliquer ces observations, il faut supposer que l'un des parents est porteur d'une mosaïque germinale et qu'il existe en fait un clone de cellules germinales porteur de la mutation.
Les mosaïques somatiques sont dues à des mutations survenues après fécondation, à un stade plus ou moins tardif de l'embryogenèse. Leurs conséquences cliniques dépendent de la nature de la mutation, du gène altéré et du tissu concerné. Elles constituent très probablement l'une des causes de l'hétérogénéité d'expression clinique des maladies héréditaires.
Si la mosaïque somatique touche les cellules germinales d'un sujet, la maladie peut alors être transmise à sa descendance.

## B. Cibles des mutations et effets sur l'expression

### 1. Perte de fonction

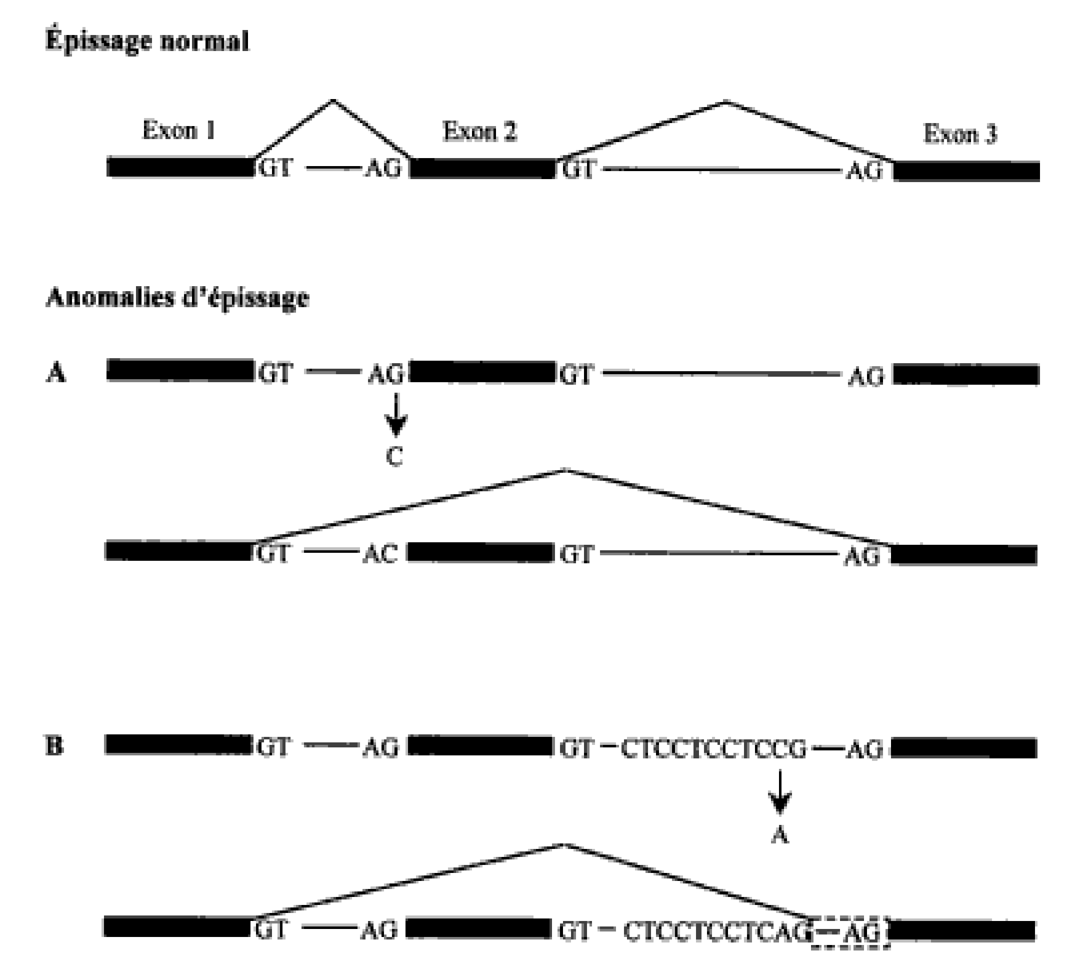
Les mutations peuvent entraîner une perte totale ou partielle d'expression de la protéine (par exemple, $\beta^0$ ou $\beta^+$ thalassémies) ou la synthèse d'une protéine partiellement ou totalement inactive : on parle alors de perte de fonction. Ce type de mutation est retrouvé dans les maladies récessives qui nécessitent pour se manifester une atteinte des deux allèles. Elles sont également retrouvées dans les maladies dominantes dites par haplo-insuffisance, comme l'hypercholestérolémie familiale dont la forme hétérozygote est beaucoup moins sévère que la forme homozygote, la perte de 50 % de l'activité du gène étant suffisante pour entraîner un phénotype clinique. Lorsqu'une maladie est liée à la perte totale ou partielle de fonction, on retrouve en général un grand nombre de mutations différentes (hétérogénéité allelique) pouvant affecter les différentes étapes de l'expression d'un gène.

#### a) Transcription (mutations au niveau du promoteur ou des séquences régulatrices)

Les premières mutations de ce type ont été caractérisées dans le promoteur du gène *HBB* codant la β-globine. Des mutations des gènes codant les facteurs de transcription eux-mêmes peuvent également être impliquées. La plupart de ces mutations sont létales ou associées à des anomalies du développement.

#### b) Maturation du prémessager en ARNm

Il s'agit de mutations affectant les sites d'épissage ou activant des sites cryptiques à l'intérieur d'un intron ou d'un exon ou encore, mais plus rarement, touchant le site de polyadénylation et responsables d'une diminution de la stabilité de l'ARNm (*fig. 10*).




A : mutations d'un site accepteur d'épissage (AG → AC). L'exon situé immédiatement en aval du site muté est généralement éliminé lors de la maturation de l'ARN pré-messager (*exon skipping*).
B : mutation ponctuelle entraînant l'activation d'un site cryptique accepteur d'épissage.

**Figure 10.** Mutations affectant la maturation des ARN prémessagers.

### c) Traduction

Les mutations non-sens (substitutions aboutissant à la formation de l'un des trois codons STOP, UAA, UAG, UGA), mutations *frameshift* et mutations du codon d'initiation de la traduction entraînent généralement l'absence de formation d'une quelconque protéine ou la formation d'une protéine tronquée dont l'activité fonctionnelle est nulle ou très réduite. Les mutations faux-sens sont responsables d'un changement d'acide aminé. Elles peuvent affecter la stabilité, l'adressage intracellulaire, la maturation de la protéine, son assemblage dans une structure multimérique, les sites importants pour l'activité enzymatique, les interactions fonctionnelles avec des ligands et d'autres protéines. Lorsqu'un changement faux-sens est survenu, il peut être difficile de distinguer une mutation pathologique d'une simple variation nucléotidique, sans effet fonctionnel, mais qui serait rare dans la population étudiée. La fréquence des événements mutationnels entraînant une perte de fonction dépend en partie de la taille de la cible (taille de la séquence codante, nombre d'exons, nombre de restes aminoacides importants pour la fonction de la protéine) et de l'existence de points (ou régions) chauds de mutation. Dans certains cas, la perte totale de fonction est létale, et seules sont admises les pertes partielles. C'est le cas notamment pour le déficit en G6PD, pour lequel n'existent que des mutations faux-sens maintenant une activité enzymatique résiduelle.

## 2. Gain de fonction

Les mutations associées à un gain de fonction sont plus rares.

### a) Effet dominant négatif

Les mutations à effet dominant négatif affectent la fonction de l'allèle normal chez les hétérozygotes. De telles mutations caractérisent les gènes codant les protéines de structure ou capables de former des homo- ou des hétérodimères. Elles entraînent des modifications conformationnelles qui affectent la fonction de la protéine normale. C'est le cas de certaines mutations responsables de l'ostéogenèse imparfaite qui affecte les gènes codant les chaînes α1 (*COL1A1*) et α2 (*COL1A2*) du collagène de type I. Une mutation affectant la structure d'une chaîne de collagène (délétion d'un ou de plusieurs exons) exerce à l'état hétérozygote un effet plus délétère (dominant) qu'une perte totale d'expression (mutations récessives), car elle empêche une association correcte de la sous-unité raccourcie aux chaînes normales (*fig. 11*).

### b) Acquisition d'une nouvelle fonction

C'est le cas de la mutation faux-sens p.Met358Arg du site actif de l'α1-antitrypsine (α1-AT), qui normalement inhibe l'élastase leucocytaire. Le nouveau variant Pittsburgh perd ses propriétés anti-élastase pour devenir un puissant inhibiteur des facteurs de coagulation de type sérine protéase et plus particulièrement de la thrombine. En conséquence les patients porteurs de cette mutation présentent un syndrome hémorragique.

### c) Surexpression

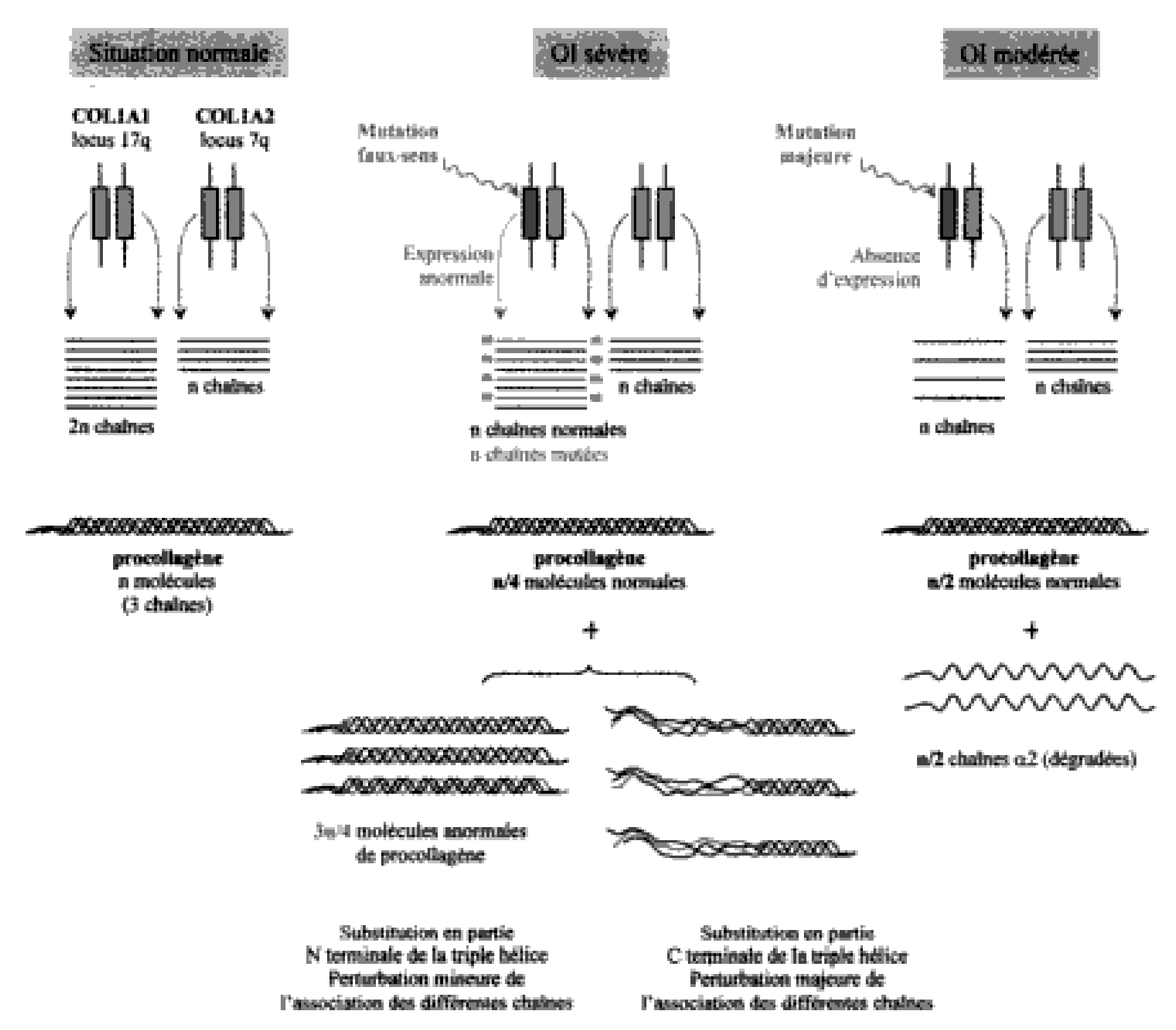
Il est exceptionnel que le gain de fonction soit lié à une surexpression. L'augmentation de la quantité de protéine faisant suite à une duplication génique est un autre mécanisme retrouvé pour la neuropathie de Charcot-Marie-Tooth de type 1A, où la surexpression de *PMP22* provoque une myélinogénèse anormale.

### d) Modification des propriétés fonctionnelles, production d'une protéine toxique

Dans d'autres cas, les propriétés fonctionnelles sont modifiées, notamment pour les hémoglobines dont l'affinité pour l'oxygène est augmentée ou diminuée, ou pour la mutation p.Gly380Arg très spécifique de FGFR3, récepteur du FGF (*fibroblast growth factor*) et responsable de l'achondroplasie. Cette mutation paraît entraîner une activation constitutive du récepteur.

Un cas particulier de gain de fonction ou de propriétés toxiques, encore inexpliqué, concerne la maladie de Huntington et d'autres maladies dites à expansion de polyglutamines. La maladie de Huntington est probablement une des seules maladies dominantes où les homozygotes ne paraissent pas plus atteints que les hétérozygotes.

Des mutations faux-sens du gène codant le précurseur du peptide β-amyloïde (APP) sont à l'origine de certaines formes précoces de la maladie d'Alzheimer. Ces mutations interfèrent avec le catabolisme de l'APP et augmentent la production de peptide βA4 dont l'agrégation en fragments insolubles est à l'origine des plaques séniles.




La molécule de collagène de type I est un hétérotrimère constitué de deux chaînes α1 et d'une chaîne α2 codées par les gènes *COL1A1* et *COL1A2* enroulées en triple hélice et qui résulte du clivage enzymatique des extrémités amino- et carboxyterminales d'un précurseur : le procollagène. Les mutations nulles de l'un ou l'autre des gènes *COL1A1* et *COL1A2* ont un effet moins sévère que les mutations responsables de l'altération de la structure de la triple hélice (d'après Strachan T. et Read A.P., 2003).

**Figure 11.** Effet dominant négatif des mutations des gènes de collagène

## 3. Perte de fonction ou gain de fonction, l'exemple de RET

RET code un récepteur de la membrane cellulaire. Lorsque son ligand, GDNF, se lie au domaine extracellulaire, il induit la dimérisation du récepteur qui transmet alors le signal à la cellule par l'intermédiaire du domaine intracellulaire à fonction tyrosine kinase.

Un grand nombre de mutations « perte de fonction » ont été rapportées interférant avec la maturation posttraductionnelle de la protéine RET, une des causes de la maladie de Hirschsprung, maladie héréditaire dominante autosomique.

Certaines mutations très spécifiques faux-sens sont retrouvées dans des maladies totalement différentes comme les cancers familiaux médullaires de la thyroïde. Ces mutations sont des mutations « gain de fonction » produisant la présence d'un récepteur qui se lie de manière excessive au ligand ou reste actif de manière constitutive et se dimérise même en l'absence du ligand.

Certains patients présentent une maladie de Hirschsprung et un cancer médullaire de la thyroïde, ce qui montre qu'une mutation peut avoir différents effets (gain ou perte de fonction) dans différents types cellulaires en fonction de l'expression du gène.

## C. Unicité ou diversité des mutations

Certaines maladies sont caractérisées par une mutation unique, d'autres par une mutation prédominante, d'autres enfin par une extrême hétérogénéité des mutations (plus de 130 pour la β-thalassémie, plus de 600 pour la mucoviscidose).

### 1. Mutation unique

Une mutation est unique lorsqu'une modification fonctionnelle très précise de la protéine ou de l'expression du gène est responsable de la maladie (anémie falciforme et mutation $\beta^S$, achondroplasie, maladie de Huntington, maladie de Steinert).
Ces mutations uniques peuvent avoir différentes origines : on a pu déduire de l'étude des haplotypes autour du gène β-globine que cinq mutations *fondatrices*, survenues il y a deux à trois mille ans, sont à l'origine des millions de porteurs du gène HbS.

### 2. Mutations prépondérantes

Les mutations prépondérantes sont expliquées soit par l'existence d'un point chaud de mutations récurrentes dans le gène (inversion dans l'hémophilie A, délétions dans l'amyotrophie spinale) ou, plus fréquemment, par un *effet fondateur* ou une dérive génétique, en général dans une population donnée (mutation p.Phe508del de la mucoviscidose, thalassémie).

### 3. Mutations hétérogènes

Une très grande hétérogénéité de mutations est quasiment la règle (hors effet fondateur) dans les maladies par perte de fonction. Les cas extrêmes d'hétérogénéité des mutations sont illustrés par la plupart des maladies sévères liées à l'X, ou par les maladies autosomiques dominantes affectant l'efficacité reproductrice des patients. Dans ces cas, les mutations sont « perdues » en quelques générations et on ne retrouve que des mutations « privées », spécifiques de chaque famille. Le spectre de ces mutations reflète alors directement la sensibilité du gène à différents mécanismes mutationnels.
Pour un certain nombre de maladies héréditaires, des bases de données sont accessibles sur l'Internet, la principale étant OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man, au National Centre of Biotechnologies Informations, NIH: http://www.ncbi.nlm.nih.gov

# Conclusion

L'identification des mutations à l'origine des maladies héréditaires monofactorielles humaines a pris ces dernières années un essor considérable. Il est devenu pos-

sible d'établir le spectre des mutations pour une maladie génétique donnée et des mécanismes mutationnels nouveaux ont été identifiés : insertions, inversions, expansions de répétitions trinucléotidiques.
La connaissance des défauts moléculaires a permis de mieux cerner les mécanismes de gain ou de perte de fonction, de comprendre le mode de transmission dominant ou récessif, d'expliquer les phénomènes d'anticipation, d'identifier des effets fondateurs au sein de populations particulières, d'établir des corrélations génotype-phénotype et de mettre à jour une hétérogénéité allélique et génétique.
L'identification des mutations délétères est également à la base du diagnostic génotypique qui occupe actuellement une place prépondérante en matière de conseil génétique et de diagnostic prénatal.

## L'essentiel de la question

L'établissement d'un arbre généalogique permet de définir le mode de transmission d'une maladie génétique.
L'hérédité récessive autosomique est liée aux autosomes. Un sujet possédant les deux allèles mutés d'un même gène est malade (homozygotes ou hétérozygotes composites). Lors de l'union la plus fréquente de deux hétérozygotes, le génotype de la descendance est composé de 1/4 de sujets homozygotes malades, 1/2 de sujets hétérozygotes sains et 1/4 de sujets homozygotes sains.
L'hérédité dominante autosomique est également liée aux autosomes. Un caractère pathologique est dominant lorsqu'il apparaît chez les sujets hétérozygotes. Lors de l'union la plus fréquente entre un sujet hétérozygote malade et un sujet sain, le génotype de la descendance est composé de 1/2 de sujets hétérozygotes malades, 1/2 de sujets homozygotes sains. Pénétrance incomplète et expressivité variable peuvent moduler le phénotype des maladies dominantes.
Les maladies récessives liées au chromosome X touchent les hommes (hémizygotes) et sont transmises par les femmes dites conductrices (hétérozygotes) apparemment saines. Lors de l'union la plus fréquente entre un homme sain et une femme conductrice hétérozygote, le génotype de la descendance est composé de 1/2 de garçons malades, 1/2 de garçons sains, 1/2 de filles conductrices hétérozygotes et 1/2 de filles saines homozygotes.
L'hérédité liée à l'X est dite dominante lorsque le gène morbide s'exprime à l'état homozygote ou hétérozygote chez la femme et hémizygote chez l'homme. L'affection s'exprime habituellement de façon plus sévère chez l'homme. La transmission de la maladie par le père touchera 100 % de ses filles, la transmission par la mère touchera 50 % de ses enfants quel que soit le sexe.
L'hérédité mitochondriale est déterminée par un gène porté par l'ADN mitochondrial dont la mutation est transmise selon le mode maternel. En effet, seules les mitochondries de l'ovocyte sont transmises à la descendance. Une femme transmet donc la mutation à tous ses enfants. L'hétéroplasmie explique habituellement l'expression très variable de ces maladies.

Les mécanismes mis en jeu dans la transmission des maladies héréditaires sont variés. Il peut s'agir de mutations ponctuelles (transitions, transversions) mais également de délétions, duplications, inversions se produisant la plupart du temps par recombinaison de séquences répétées homologues ou par recombinaison illégitime entre deux séquences non homologues. L'amplification de triplets nucléotidiques est également en cause dans un certain nombre de maladies. Des mécanismes plus rares peuvent intervenir : la conversion génique, insertion de séquences répétées dispersées, réarrangements chromosomiques. Ces mutations peuvent être héritées ou apparaître *de novo* et se transmettre alors à la descendance.
Les conséquences de la présence de ces mutations sont la perte ou le gain de fonction de la protéine codée par le gène muté en cause.
On parle de perte de fonction lorsque la mutation entraîne une perte totale ou partielle d'expression du gène ou la synthèse d'une protéine partiellement ou totalement inactive. Les mutations en cause peuvent être retrouvées au niveau du promoteur ou des séquences régulatrices de l'expression de gènes. Elles peuvent également affecter l'épissage de l'ARNm, sa polyadénylation, sa traduction (mutations faux-sens, non-sens, *frameshift*, apparition d'un codon STOP). La perte de fonction est retrouvée dans la majorité des maladies récessives et dans les maladies dominantes par haplo-insuffisance.
On parle de gain de fonction lorsque les mutations en cause présentent un effet dominant négatif (le produit de l'allèle muté affecte la fonction de la protéine codée par l'allèle normal) ou entraîne l'apparition d'une nouvelle fonction, une surexpression, ou une modification des propriétés fonctionnelles de la protéine (production d'une protéine toxique).

### *Pour en savoir plus*


- Feingold J., Fellous M., Solignac M. *Principes de génétique humaine*. Paris, Hermann, 1998.
- Labrune P. *Hérédité monofactorielle : construction et interprétation d'un arbre généalogique – Principes du conseil génétique. Pédiatrie 2*. Paris, Doin, coll. « Intermed », 1999.
- Pasternak J.J. *An introduction to human molecular genetics: mechanisms of inherited deseases*. Bethesda (États-Unis), Fitzgerald Science Press Inc., 1999.
- Strachan T., Read A.P. *Human Molecular Genetics 3*. Garland Science Publishing, 3[e] éd., 2003.
- Hanna N., Parfait B., Vidaud D., Vidaud M. *Mécanismes et conséquences des mutations*. Med Sci 2005 ; 11 (21) : 969-80.

# Les méthodes d'analyse des variations de séquence des acides nucléiques

S. MOUTEREAU, S. LORIC
Service de biochimie-génétique, Hôpital Henri Mondor, AP-HP, Créteil.

*La question rédactionnelle de biologie moléculaire, « Les méthodes d'analyse des variations de séquence des acides nucléiques », telle qu'elle est apparue au Journal officiel dans la section II (question 3), se devrait de couvrir l'intégralité des techniques d'analyses de séquences qui sont aussi nombreuses que variées. À la faveur des programmes de séquençage de génomes entiers (de la levure à l'homme), les techniques employées évoluent sans cesse : miniaturisation, baisse des coûts, automatisation, etc. Il est impossible aujourd'hui d'être exhaustif sur le sujet. Nous détaillerons donc, d'une part, les techniques qui ont fait date dans l'histoire et qui sont, à défaut d'être employées en routine, toujours, pour la plupart, utilisées dans des laboratoires de recherche et, d'autre part, les techniques plus récentes, qui sont à la base de toutes les analyses de séquence réalisées dans les laboratoires de génétique moléculaire.*
*Néanmoins, les nouveaux automates restent très coûteux et sont donc réservés à des laboratoires de taille conséquente. Les anciennes techniques, parmi lesquelles figure toujours la méthode historique de Southern, couplée ou non à l'amplification in vitro (polymerase chain reaction, PCR), sont encore très employées, en particulier dans les laboratoires de recherche. En effet, l'analyse des variations de séquence de l'ADN est tout aussi indispensable lorsqu'il est nécessaire de préciser la séquence d'un gène nouvellement cloné que lorsqu'il s'agit de mettre en évidence une altération génique d'un gène connu ayant un retentissement clinique. Au niveau d'un ARN messager, l'analyse s'attachera surtout à rechercher l'existence de modifications transcriptionnelles pouvant avoir un retentissement direct sur la synthèse et/ou la fonctionnalité de la protéine traduite. Sur le plan clinique, ces analyses seront menées à la fois pour objectiver des modifications constitutionnelles (maladies génétiques) et des modifications acquises (mutations somatiques des pathologies cancéreuses).*

# I. Rappel sur les anomalies géniques pouvant donner lieu à des modifications de séquence

Ces anomalies peuvent se produire en tout point d'un gène et avoir ou non un retentissement clinique. On distingue les macrolésions, intéressant de grandes parties de matériel génétique, des microlésions, qui n'affectent que des parties extrêmement limitées du génome.

## A. Macrolésions

### 1. Délétions et insertions

Les *délétions* résultent de l'excision d'un segment d'ADN avec rétablissement de la continuité de la double hélice. La perte de matériel est généralement variable, allant de quelques dizaines de paires de bases jusqu'à plus de cinq millions de paires de bases. Néanmoins, ce seuil est très largement dépassé dans les très grandes délétions intéressant tout un segment chromosomique, voire un chromosome entier.
Une délétion complète supprime, bien entendu, toute synthèse de l'ARNm donc de la protéine concernée. Une délétion partielle d'un ou plusieurs exons aboutit

soit à une absence de protéine, soit à la formation d'une protéine tronquée. Une délétion dans une zone régulatrice abolit ou diminue la synthèse, la protéine résiduelle restant normale. Une modification du cadre de lecture aboutit à la synthèse d'une protéine aberrante.

Le mécanisme des délétions est le plus souvent un *crossing-over* inégal par recombinaison entre des séquences homologues non alléliques soit à l'intérieur d'un même gène, soit à l'extérieur du gène (délétion partielle ou complète).

Les *insertions* peuvent être rapprochées des délétions. À l'inverse, elles correspondent à l'introduction dans un gène d'une séquence exogène mobile (transposon) ou d'origine virale, voire d'un segment délété ailleurs dans le génome.

## 2. Amplification génique

Elle concerne la multiplication, souvent en tandem, de séquences normalement présentes en exemplaire unique dans le génome. Cette amplification peut se manifester jusqu'à l'apparition de minichromosomes surnuméraires (double-minute).

Ce type de phénomène apparaît surtout dans des processus tumoraux. L'amplification du segment portant le gène d'intérêt conduit alors à la production d'une grande quantité de la protéine correspondante par les cellules tumorales. Si cette protéine correspondante est dotée de propriétés proto-oncogéniques, elle va avoir des effets importants sur les cellules tumorales adjacentes. L'exemple type est celui de l'amplification du proto-oncogène c-erbB2 dans les cancers du sein. Ce gène est amplifié jusqu'à dix fois dans les cellules mammaires tumorales. Il code pour la protéine ERBB2 qui est le récepteur au facteur de croissance EGF (*epidermal growth factor*). La réponse des cellules tumorales à ce facteur de croissance est donc fortement amplifiée, ce qui concourt à une augmentation de la prolifération cellulaire néoplasique.

## 3. Réarrangements géniques

### a) Conversion génique

Elle correspond au remplacement de tout ou partie de la séquence d'un gène par celle d'un gène apparenté par échange de brins d'ADN entre deux locus similaires.

### b) Fusion de gènes

Pour que se déroule une fusion de gènes, une double cassure doit se produire dans deux gènes distincts avec transposition de l'un dans l'autre. Cette transposition peut se faire à l'intérieur d'un chromosome ou intéresser deux chromosomes différents. Dans ce dernier cas, il s'agit d'une translocation (par exemple, fusion bcr-abl du chromosome Philadelphie). Dans l'ADN résultant de la translocation, les gènes peuvent être raboutés soit dans le même sens, soit dans une orientation opposée.

### c) Inversion

Elle correspond au changement d'orientation, tête-bêche, d'un segment plus ou moins long de l'ADN.

## B. Microlésions

### 1. Mutations

Une mutation ponctuelle, selon sa localisation aux abords ou dans le gène, peut avoir des conséquences transcriptionnelles et/ou traductionnelles.
L'existence de mutations dans les régions régulatrices 5' du gène (en particulier dans les boîtes TATA ou CAAT) peut déprimer ou même supprimer la biosynthèse protéique. D'autres peuvent affecter l'épissage des ARNms produits. Une mutation pourra créer un nouveau site d'épissage sur un exon, de sorte qu'une partie de cet exon sera épissée par activation de sites cryptiques d'épissage. Une mutation dans la région consensus d'épissage à la jonction intron-exon peut supprimer un site d'épissage de sorte que l'intron ne sera pas éliminé. On obtient donc un épissage alternatif qui, la plupart du temps, réduira la synthèse protéique normale sans toutefois la supprimer. De la même manière, on observe des mutations en 3' dans la partie non codante du gène, en particulier au niveau du signal de polyadénylation. Toutes ces mutations à retentissement transcriptionnel et post-transcriptionnel peuvent aboutir à l'accumulation de transcrits instables au niveau nucléaire ou qui, simplement modifiés pourront toutefois être traduits.
Lorsqu'un tel changement se produit dans la partie codante du gène, un acide aminé (AA) est remplacé par un autre. Si la base modifiée est la troisième d'un codon, il s'agit le plus souvent d'une mutation neutre puisque, la nature de l'AA codé reste généralement inchangée. Si la nature de l'AA change avec la mutation, l'activité de la protéine synthétisée est généralement altérée : il s'agit d'une mutation faux-sens. Deux autres cas sont envisageables :

- une mutation peut aboutir à la formation d'un codon de terminaison et interrompre prématurément la synthèse laissant une protéine tronquée généralement inactive ou non viable (mutation non-sens) ;
- à l'opposé, le remplacement du codon normal de terminaison en un codon signifiant donne une protéine prolongée (jusqu'au codon STOP suivant), en général instable.

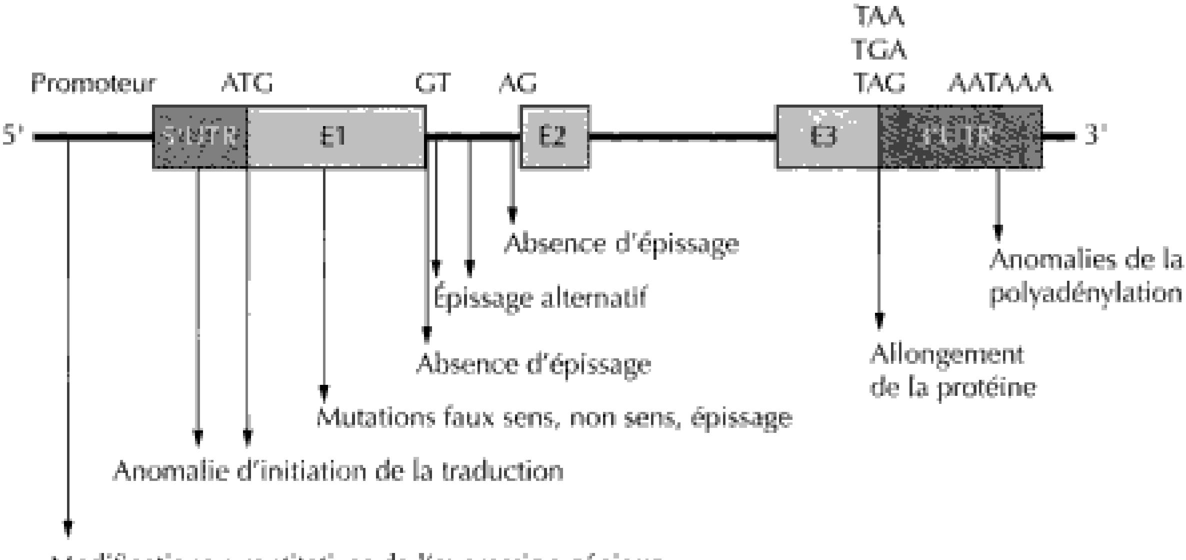



**Figure 1.** Modifications induites par une mutation ponctuelle dans les zones intra- et juxtagéniques

### 2. Dérapage réplicatif

Il s'agit d'accidents réplicatifs qui vont favoriser une amplification ou une réduction du nombre de répétitions au niveau des régions du génome présentant des successions de courts motifs répétés (mono- ou oligonucléotidique). Ces régions semblent être des zones instables facilement sujettes à des polymorphismes. Ce type de mécanisme est incriminé dans la survenue d'un certain nombre de syndromes (X-fragile, Kennedy, etc.). Plusieurs types d'altérations existent donc, qui peuvent affecter une séquence d'acides nucléiques :

- certaines affecteront qualitativement la nature de la séquence d'acides nucléiques (ADN ou ARN) et avoir un retentissement sur la nature des protéines traduites ;
- d'autres auront un effet quantitatif qui modifiera l'homéostasie cellulaire (amplification génique de certains oncogènes).

L'analyse moléculaire qui sera mise en œuvre visera principalement à objectiver ces modifications de séquence et, si possible, à corréler le génotype au phénotype. Dans certains cas (pathologies cancéreuses notamment), les variations quantitatives pourront avoir un impact pronostique sur le devenir des malades.

## II. Analyse qualitative des variations de séquence

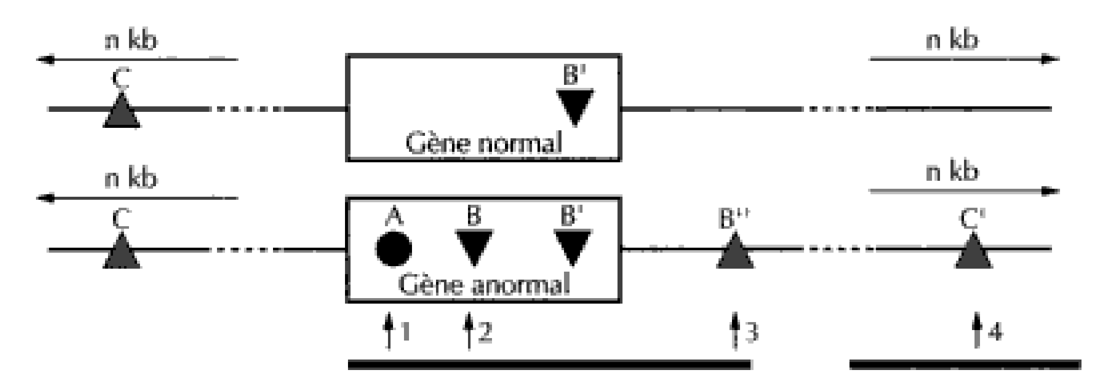
On dispose d'une grande variété d'outils pour l'étude des anomalies génétiques. Ces outils peuvent s'appliquer à l'étude de l'ADN, présent dans toutes les cellules de l'organisme et donc dans les lymphocytes sanguins, ou à celle de l'ARN dont l'accessibilité est limitée aux cellules des tissus où le gène est exprimé. Lorsque le gène s'exprime dans les lymphocytes sanguins ou dans d'autres cellules facilement accessibles, il peut être plus avantageux d'étudier l'ARN, qui contient une majeure partie de la séquence du gène où se trouvent les mutations, plutôt que l'ADN dont l'analyse peut s'avérer longue et coûteuse lorsqu'il s'agit d'analyser certains grands gènes.

### A. Analyse de l'ADN

Lors d'une analyse génétique, plusieurs cas de figure peuvent être envisagés et influer sur la nature des examens à mettre en œuvre :

- si le gène responsable est cloné ;
- si la lésion est connue et univoque, l'existence d'une altération de ce gène peut être mise en évidence directement et ne réclame aucune étude familiale préalable (diagnostic direct) ;
- si la lésion est très variable ou inconnue, le diagnostic peut être obtenu par l'exploration de polymorphismes intra- ou juxtagéniques à l'aide de sondes spécifiques du gène (diagnostic semi-direct) ;
- si le gène en cause est totalement inconnu, l'approche employée pour le diagnostic semi-direct peut être mise en œuvre. On utilise alors des polymorphismes de restriction (RFLP) situés aussi près que possible du locus morbide et l'encadrant (*diagnostic indirect*). L'association entre l'allèle de restriction et l'allèle pathologique est fortuite et va varier d'une famille à l'autre. Il faut alors pratiquer une

étude généalogique des polymorphismes de chaque famille. La fiabilité du diagnostic par polymorphismes liés dépend du risque de recombinaison qui est proportionnel à la distance génétique entre le site de restriction utilisé pour le diagnostic et le siège de la mutation pathologique.




**Méthode directe :**
1. Détection de la mutation (A) par une sonde spécifique du gène et reconnaissance de la lésion (sonde spécifique du gène)

**Méthodes indirectes :**
2. Mise en évidence d'un site polymorphe intragénique (B) associé à la lésion (sonde spécifique du gène)
3. Mise en évidence d'un site polymorphe juxtagénique (B'') associé à la lésion (sonde spécifique du gène)
4. Mise en évidence d'un site polymorphe (RFLP) extragénique (C') génétiquement associé au locus morbide (sonde anonyme)

C' et B' sont respectivement des polymorphismes extra et intragéniques associés à un allèle normal.

**Figure 2.** Méthodes de diagnostic d'un gène anormal

Ces stratégies sont appliquées à un certain nombre de maladies génétiques monofactorielles, pour le diagnostic prénatal, le diagnostic des hétérozygotes et le diagnostic des néomutations. En cancérologie, les anomalies de l'ADN somatique bénéficient de la même approche méthodologique.
Parmi les méthodes de détection des mutations, on distingue celles qui sont fondées sur la recherche spécifique d'une ou plusieurs mutations connues (techniques dites de « criblage ») de celles dites de « balayage » (*scanning*), qui détectent n'importe quelle variation de séquence dans une séquence d'ADN ou d'ARN de quelques centaines de paires de bases, sans préjuger de leur localisation ni de leur nature. Ce sont ces dernières qui permettent de déterminer le spectre des mutations les plus fréquentes responsables d'une maladie. De là, il est possible de définir, de mettre au point et d'utiliser ainsi en première intention les outils de criblage les mieux adaptés.

## 1. Recherche d'une mutation ponctuelle connue (diagnostic génotypique direct)

### a) Diagnostic direct par apparition ou suppression d'un site de restriction au site de mutation

#### ■ *La méthode de Southern*

Cette méthode reste le prototype de la méthode employée pour analyser le génome humain. Son efficacité repose sur la mise en œuvre sur support solide (une des séquences complémentaires est immobilisée) d'une propriété fondamentale des acides nucléiques, l'*hybridation*, qui permet à deux séquences complémentaires d'acides nucléiques de s'associer entre elles de manière spécifique. La méthode de Southern repose sur une hybridation ADN-ADN.

*Principe de la méthode* : tout changement de séquence nucléotidique (le plus souvent en un point) peut suffire à faire apparaître ou disparaître une séquence spécifique constituant un site de restriction pour une endonucléase. Dès lors, l'utilisation de cette enzyme de restriction sur l'ADN portant cette mutation va permettre de l'objectiver lorsque le profil de restriction sera comparé à un profil témoin. Cette technique comporte les étapes suivantes :

- fragmentation de l'ADN génomique par une enzyme de restriction appropriée ;
- séparation par électrophorèse en gel d'agarose des fragments obtenus ;
- agitation du gel dans une solution de soude qui casse l'ADN en petits fragments et dissocie l'ADN de sa forme bicaténaire en forme simple brin ;
- transfert de l'ADN (*blotting*) présent dans le gel sur une membrane de nylon (plus résistant que la nitrocellulose) par capillarité. Le gel est déposé toute une nuit sur un système qui assure son hydratation en continu. L'ensemble est recouvert d'un épais paquet de papier très hydrophile qui absorbe le liquide contenu dans le gel d'agarose et crée un courant liquidien ascendant qui entraîne l'ADN. Le système peut être accéléré en utilisant un système d'aspiration sous vide, ou en appliquant un courant électrique (*electroblotting*) ;
- l'ADN transféré sur la membrane y est ensuite fixé de manière covalente soit par cuisson à 80 °C pour la nitrocellulose, soit par irradiation aux UV pour le nylon ;
- la membrane portant l'ADN à typer est ensuite préhybridée (deux heures) avec de l'ADN extrait de sperme de saumon pour saturer les sites potentiels de fixation non spécifique ;
- puis, la membrane préhybridée est hybridée à température élevée (55 °C-65 °C) pendant plusieurs heures avec une sonde monobrin spécifique marquée (le plus souvent radiomarquée pour atteindre la sensibilité requise) qui ira se fixer préférentiellement sur la séquence cible complémentaire ;
- la membrane est ensuite lavée avec des solutions de stringence croissante afin d'enlever la majeure partie du marquage aspécifique (le ou les fragments reconnus par la sonde forment avec celle-ci un duplex qui résiste aux différents lavages) ;
- la visualisation des bandes est effectuée par autoradiographie (maintenant également par des techniques froides). La qualité du signal dépend directement de la nature de la sonde (plus elle est longue et marquée, meilleur est le résultat). La valeur du rapport signal-bruit dépend directement de la qualité des lavages.

### ■ *Applications de la technique de Southern*

#### Établissement de cartes de restriction

Dans ce cas, on étudiera en parallèle l'action de plusieurs enzymes de restriction sur l'ADN génomique. Cette étude permettra de comparer des profils de restriction. La comparaison des cartes de restriction de l'ADN génomique et de l'ADN complémentaire est utilisée aussi pour repérer les parties introniques.

#### Mise en évidence de pseudogènes et des gènes apparentés

Une sonde suffisamment longue peut s'hybrider avec une séquence légèrement divergente de la séquence complémentaire idéale si les conditions de stringence ne sont pas trop fortes. C'est ainsi que l'on peut détecter des séquences homologues appartenant aux gènes d'une même famille.

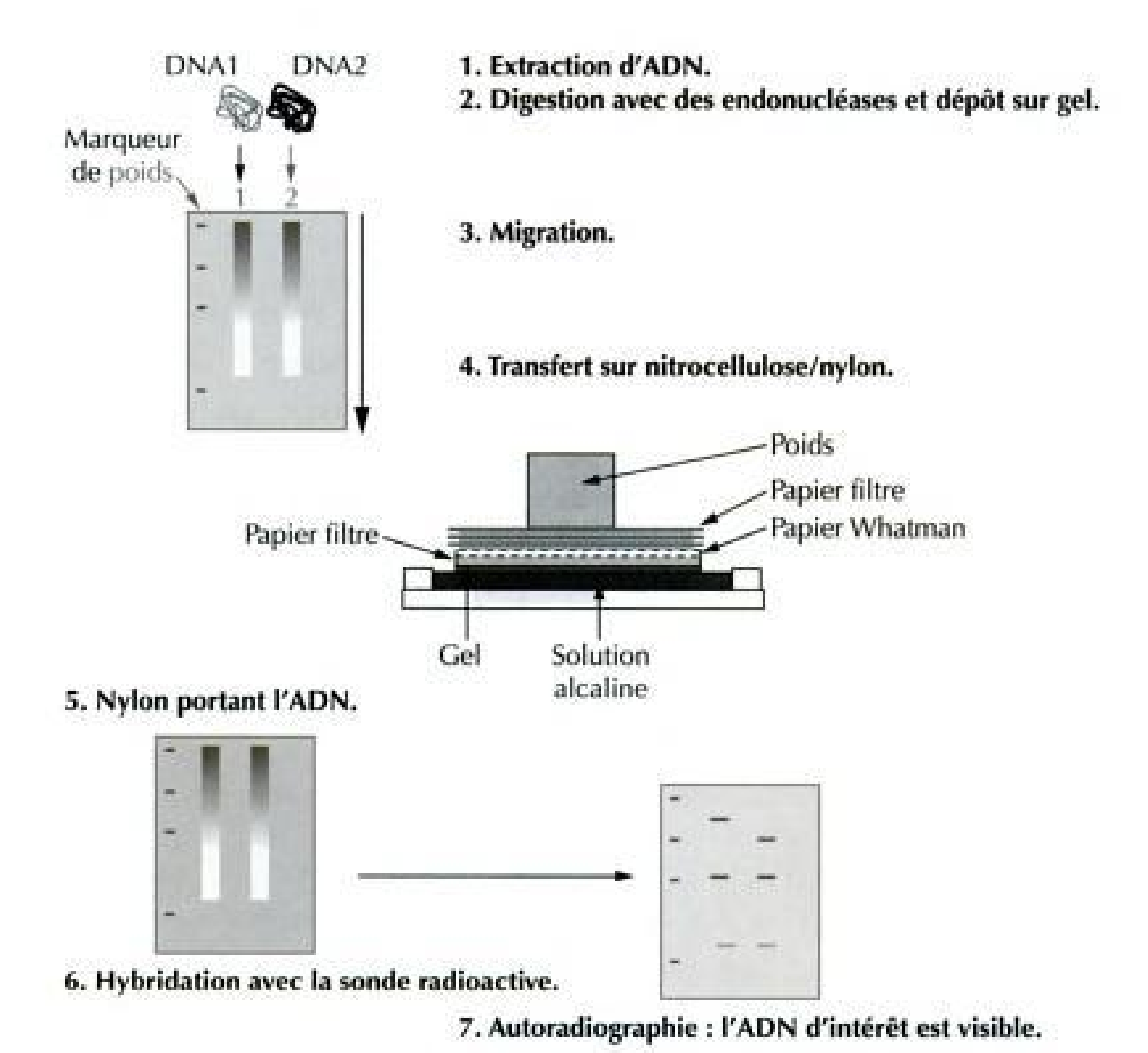



**Figure 3.** Technique d'hybridation de Southern (*Southern blot)*

### Détection des polymorphismes

L'existence d'un polymorphisme au niveau de l'ADN génomique est une des causes fréquentes de variation des longueurs des fragments de restriction que l'on peut observer dans une population. Si la variation touche plus de 1 % des individus non apparentés, il s'agit d'un polymorphisme de restriction (révélé par des modifications de la carte de restriction).

### Détection des délétions

Si ces délétions sont supérieures à cinquante paires de bases (bp), on peut les objectiver par une diminution de la longueur d'un fragment de restriction, voire sa disparition. Néanmoins, les délétions partielles ne peuvent pas être affirmées sans l'exploration par d'autres enzymes de restriction de manière à apporter la preuve que le raccourcissement observé ne correspond pas simplement à une mutation ponctuelle créant un seul site supplémentaire.

### Détection de certaines mutations ponctuelles et de recombinaisons

Certaines mutations ponctuelles peuvent être mises en évidence par la disparition ou la création d'un site de restriction. De la même manière, on objectivera la survenue éventuelle de phénomènes recombinatoires par modification de la carte de restriction.

**Limites de la technique**

Cette analyse suppose que la carte de restriction du domaine génomique exploré est déjà connue afin de déterminer le choix du couple optimal sonde-enzyme. Les variations mises en évidence sont le plus souvent d'ordre qualitatif (modification de la carte de restriction). On peut cependant utiliser cette technique pour évaluer de manière semi-quantitative l'expression d'un gène (variation du nombre de copies) (voir « *Analyse quantitative de l'expression des gènes* »).
Cette technique reste une technique longue, compliquée, coûteuse en réactifs (elle nécessite le plus souvent l'emploi de radionucléides pour marquer les sondes car les sondes froides restent moins sensibles) et en main-d'œuvre. En outre, elle s'avère peu propice à l'automatisation. Enfin, son interprétation est difficile et les artéfacts nombreux. Elle a donc naturellement perdu peu à peu de sa prééminence avec l'apparition de la PCR.

**Variantes et améliorations de la technique**

Certaines enzymes de restriction bactériennes qui coupent en des sites palindromiques très remarquables et faiblement représentés dans le génome ont pu être isolées. Leur association à la séparation des acides nucléiques par électrophorèse en champ pulsé (qui permet de séparer des grands fragments d'ADN de 50 kb à plusieurs mégabases) a permis la réalisation de macrocartes de restriction qui ont jeté les premières bases du clonage de génomes entiers (en particulier chez les bactéries).

## ■ *Utilisation de la PCR*

Afin de disposer de matériel à analyser en quantité importante, on réalise une amplification préalable du fragment à étudier, qui pourra par la suite être coupé par une enzyme de restriction. La quantité de matériel obtenu est suffisante pour permettre une lecture directe des bandes en gel d'agarose (coloré au bromure d'éthidium, BET) en évitant l'étape de transfert sur membrane. Pour augmenter la sensibilité de la méthode, il est possible d'associer à la séparation des produits de PCR une hybridation à l'aide d'une sonde spécifique (couplage PCR-Southern blot).

**Principe de la technique**

La PCR met à profit une des propriétés des ADN polymérases, ADN dépendantes. Ces enzymes sont capables de synthétiser le brin complémentaire d'un brin cible à partir d'une amorce (petite séquence oligonucléotidique capable de se fixer sur sa partie complémentaire présente sur le brin cible). Par réplications successives, la séquence désirée est alors amplifiée.
Généralement, on choisit des amorces oligonucléotidiques synthétiques capables de s'hybrider aux bornes de la partie de l'ADN d'intérêt à amplifier en 5' de chacun des brins. En mélangeant les deux amorces avec de l'ADN génomique dans des conditions d'hybridation, elles se positionnent en face de leurs séquences complémentaires respectives. Puis, en faisant agir une ADN polymérase, chaque amorce est allongée dans le sens 5'-3' d'une séquence exactement complémentaire du brin recopié. Il en résulte un doublement de la séquence considérée à chaque réplication puisque chaque brin est recopié. L'opération est ensuite recommencée et l'augmentation de produit formé est donc exponentielle. Après trente cycles, on obtient une amplification moyenne de $10^6$. La migration dans un gel d'agarose permet ensuite de séparer le produit d'amplification (*fig.* 4).

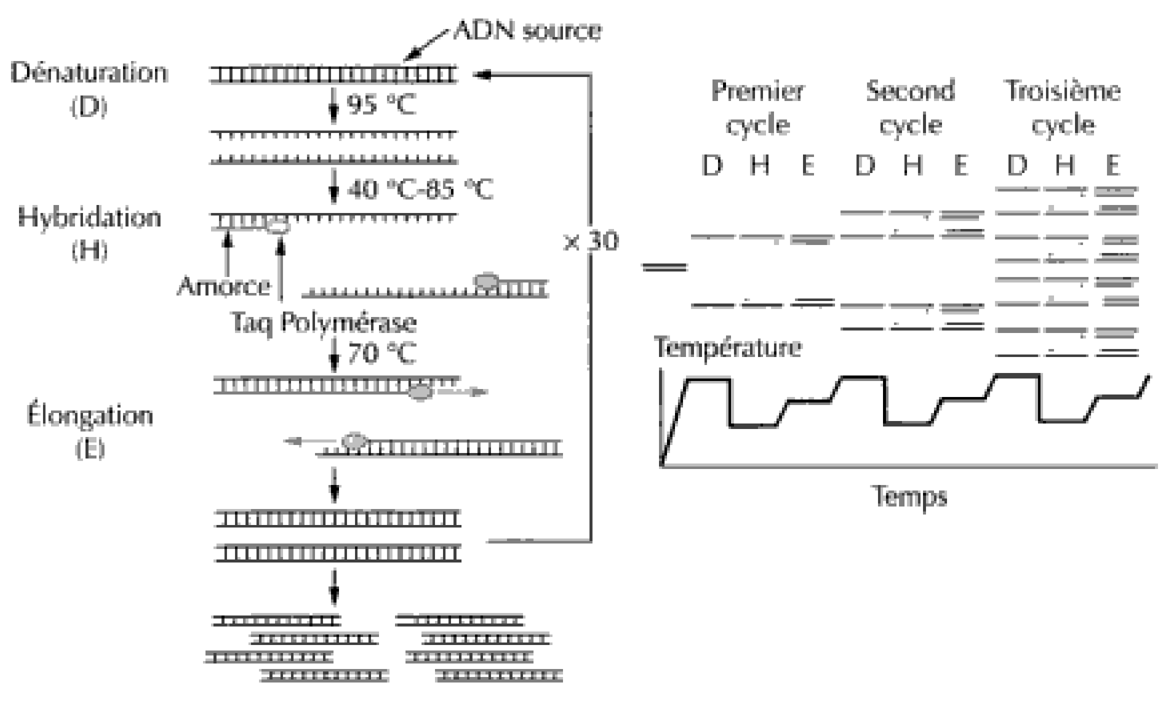



**Figure 4.** Amplification de l'ADN par PCR

Les trois étapes composant un cycle de PCR sont donc :
- une phase de dénaturation à 94 °C qui sépare les deux brins ;
- une phase d'hybridation à une température variant de 55 à 65 °C (température optimale de fixation des amorces sur leur cible) ;
- une phase d'élongation à 72 °C où la Taq polymérase recopie le brin cible.

Chaque étape dure en général moins d'une minute et chaque cycle produit un doublement de la séquence comprise entre deux amorces. L'amplification est donc exponentielle. Au bout de n cycles, on obtient théoriquement $2^n$ exemplaire du fragment d'ADN dont les extrémités sont définies par les extrémités 5' des amorces utilisées.
La méthode est très simple à réaliser car elle ne nécessite que des variations de température, tous les cycles étant réalisés dans le même tube grâce à l'utilisation d'une polymérase thermorésistante (à côté de la Taq polymérase universellement employée, d'autres polymérases thermostables isolées à partir de différentes bactéries sont aujourd'hui utilisables). Cette technique est automatisée et permet donc d'amplifier à volonté n'importe quelle séquence d'ADN à condition de disposer d'amorces adéquates et donc de connaître la séquence d'ADN à amplifier. La longueur des amorces (20 à 25 bp) permet en général d'éviter les hybridations parasites. On peut donc obtenir sans clonage une amplification considérable d'une cible donnée d'ADN dont le produit peut facilement être automatisé. L'analyse du produit peut se faire de différentes façons :
- clivage du produit de PCR par une enzyme de restriction (si la mutation induit la modification d'un site de restriction) puis analyse par électrophorèse sur gel coloré au BET ;
- dépôt des produits de PCR sur membrane (*dot* ou *slot blot*) et hybridation avec des oligonucléotides internes marqués (oligosondes) spécifiques de l'allèle normal et de l'allèle muté ;
- insertion du produit de PCR dans un vecteur et séquençage ;
- séquençage direct du produit de PCR.

**Avantages de la technique**

Par rapport à une technique de Southern classique, la PCR est beaucoup plus sensible. Si 1 µg d'ADN (soit 150 000 cellules) correspondait à la quantité minimale d'ADN pour réaliser un Southern blot, la PCR peut théoriquement descendre à une cellule. La méthode s'avère rapide (généralement deux heures, mais on réalise maintenant des réactions de PCR en capillaire qui permettent d'effectuer trente cycles de PCR en une vingtaine de minutes), facile à mettre en œuvre et largement automatisable.

**Limites de la technique**

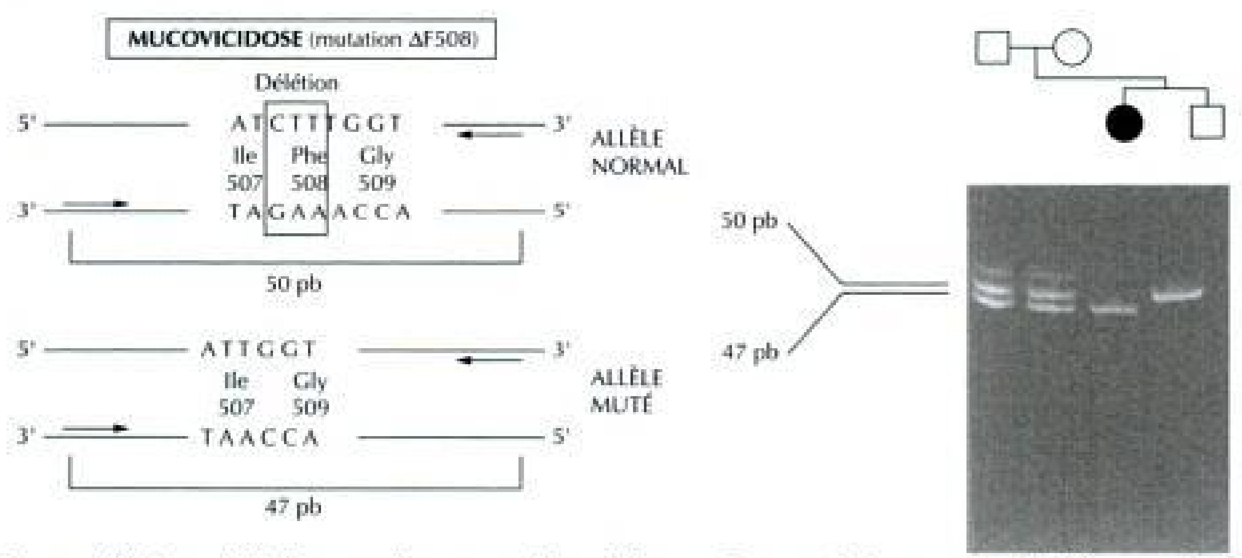
La limite principale de la PCR concerne la contamination des produits PCR par d'autres ADN, en particulier par les ADN provenant d'autres produits de PCR préalablement amplifiés. Pour s'en affranchir, il convient donc de mettre en place des conditions draconiennes de circulation des acides nucléiques :

- pièce de mélange (mix) où sont réalisés les mélanges réactionnels contenant la Taq polymérase et son tampon, les amorces, mais où jamais ne rentreront des acides nucléiques (cette pièce est généralement en surpression) ;
- pièce pré-PCR où le mélange réactionnel est mis en contact avec les acides nucléiques à tester ;
- pièce de PCR où sont réalisées les amplifications ;
- pièce post-PCR où seront réalisées les techniques permettant de visualiser la séquence amplifiée.

La seconde limite de la technique réside dans la taille du fragment à amplifier. Si l'amplification de fragments inférieurs à 1,5 kb est assez aisée, il faudra recourir pour des fragments plus longs (jusqu'à 3 kb) à des polymérases capables de les amplifier sans erreurs.

**Applications de la technique**

La PCR possède un champ d'application très vaste. Elle est applicable à la recherche de mutations, de délétions, de recombinaisons, de fusions géniques (type bcr-abl pour la leucémie myéloïde chronique). En revanche, la limitation en taille des fragments à analyser empêche son utilisation pour analyser des grands fragments du génome et réaliser des cartes de restriction (*fig. 5*).




Les amplimères délétés sont plus courts de trois bases. Cette variation est visualisable sur gel de polyacrylamide.

**Figure 5.** Mise en évidence par PCR d'une des délétions responsables de la mucoviscidose

**Variante de la technique : le PCR multiplexe**
Cette variante consiste à réaliser une amplification dans un tube unique avec plusieurs couples d'amorces spécifiques d'une partie du gène à étudier. Chaque produit d'amplification peut avoir une taille différente afin d'être différencié lors de l'analyse électrophorétique.

### b) Mise en évidence de mutations ponctuelles par hybridation avec des oligosondes synthétiques (*allele specific oligoprobe*, ASO)

#### ■ *Principe de la technique ASO*
Cette technique permet de mettre en évidence la présence d'une mutation ponctuelle dans de courts fragments. Deux oligonucléotides sont synthétisés et marqués avec un isotope radioactif ou un marqueur froid : l'un hybride la séquence normale et l'autre la séquence mutée. Ces oligonucléotides sont alors mis en présence avec l'ADN du patient à tester dans un milieu où les conditions n'autorisent que des appariements parfaits. Le moindre mésappariement empêche toute hybridation.
En pratique, l'ADN à étudier est amplifié par PCR de manière à obtenir une séquence quasiment pure du segment à analyser. Quelques µl de solution sont déposés en tâche (*dot*) sur deux membranes de nylon. La première membrane est alors hybridée avec une oligosonde dont la séquence est équivalente à la séquence normale du gène, tandis que la seconde est hybridée avec l'oligosonde correspondant à la séquence mutée du gène. Si l'ADN du sujet à tester est muté, il doit s'hybrider avec l'oligosonde mutée et inversement. Un signal positif sera obtenu avec les deux sondes chez un hétérozygote.

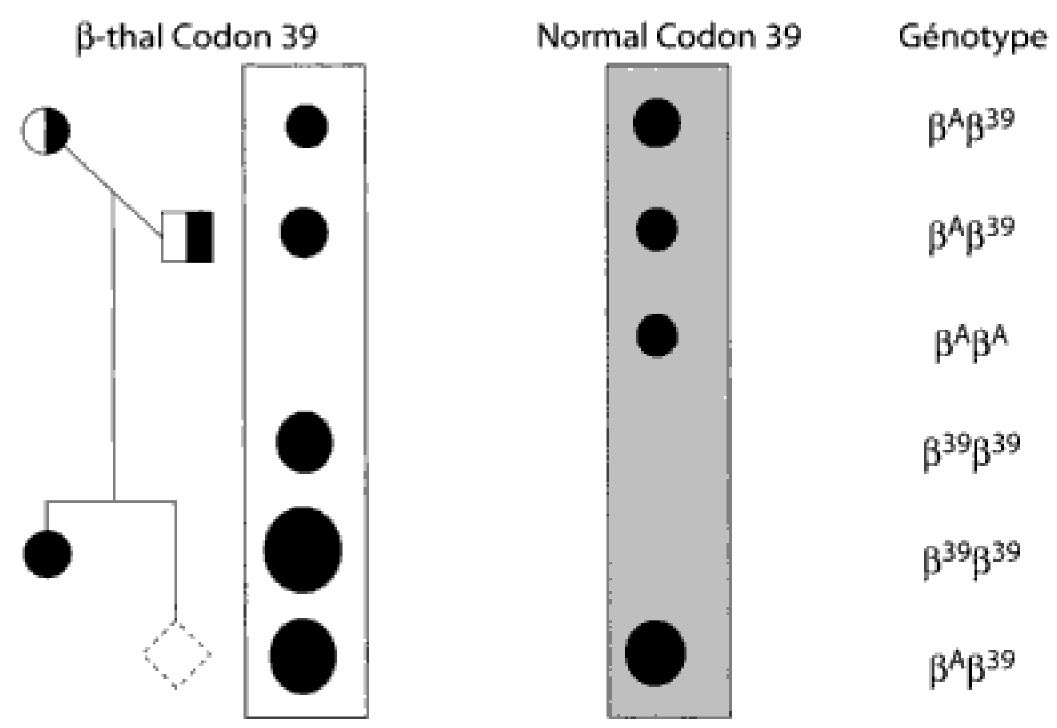



**Figure 6.** Hybridation post-PCR allèle spécifique et révélation par dot blot pour la détection de la β-thalassémie

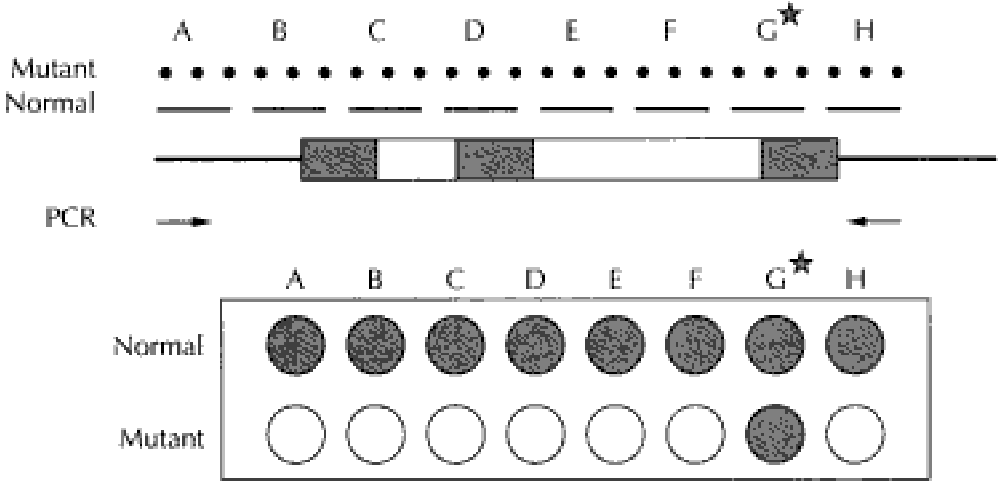
#### ■ *Limites de la technique ASO*
Utilisée sans amplification préalable de la séquence à tester, la méthode engendrait des sondes des signaux parasites et donc un important bruit de fond lors de l'hybridation. L'amplification préalable est donc indispensable.

La technique nécessite l'emploi de quatre oligonucléotides (deux pour l'amplification préalable et deux pour les sondes) et reste très sensible aux conditions de stringence de l'hybridation. Il est donc obligatoire pour se prémunir de toute erreur d'employer un grand nombre de témoins en parallèle.

■ ***Variantes***

**Reverse ASO**

Lorsqu'il existe une hétérogénéité allélique dans la région amplifiée, on peut inverser la procédure d'ASO (*reverse dot*). Dans ce cas, l'amplimère marqué par la biotine est hybridé à un filtre sur lequel une batterie de sondes de type ASO est fixée de manière covalente. Une tâche doit apparaître avec un seul ASO indiquant directement la nature de la mutation. Cette technique est à la base de techniques automatisées sous la forme de biopuces à ADN.




Plusieurs sondes marquées sont fixées sur la membrane. Le produit de PCR porteur de la mutation s'hybride à son complémentaire.

**Figure 7.** *Reverse* ASO

**Amplifications allèles dépendantes**

L'allèle *specific* PCR (ASPCR) et l'*amplification refractory mutation system* (ARMS) sont des techniques d'amplification utilisant des amorces choisies de telle manière qu'elles n'amplifient que la séquence normale. Avec la séquence mutée, la technique ARMS associe à la technique ASPCR l'utilisation d'amorces présentant une autre mutation à distance afin de déstabiliser encore plus les hybrides imparfaits. Ces techniques peuvent utiliser des amorces marquées avec des fluorochromes différents pour distinguer directement les allèles après électrophorèse.

*TaqMan 5' nuclease assay* : il est ici nécessaire de disposer de bons témoins à cause du problème récurrent des hétérozygotes. En effet, leur détection peut, là encore, être délicate puisqu'elle repose sur l'existence d'un signal positif obtenu à la fois avec les versions sauvages et mutées des amorces.

### c) Ligation répétitive d'oligonucléotides (LCR)

Cette technique va associer hybridation et ligation. Pour cela, deux oligonucléotides s'hybridant au niveau de la séquence mutée sont synthétisés. Le premier oligonucléotide doit s'arrêter immédiatement avant la base mutée et la première base du second oligonucléotide, qui correspond à la base susceptible d'être mutée. Les

deux oligonucléotides sont hybridés avec l'ADN à tester puis une ligase (thermostable) doit souder bout à bout les deux oligonucléotides s'ils se suivent parfaitement (absence de mutation). Plusieurs cycles d'hybridation-ligation sont réalisés. Le produit obtenu est analysé par électrophorèse.

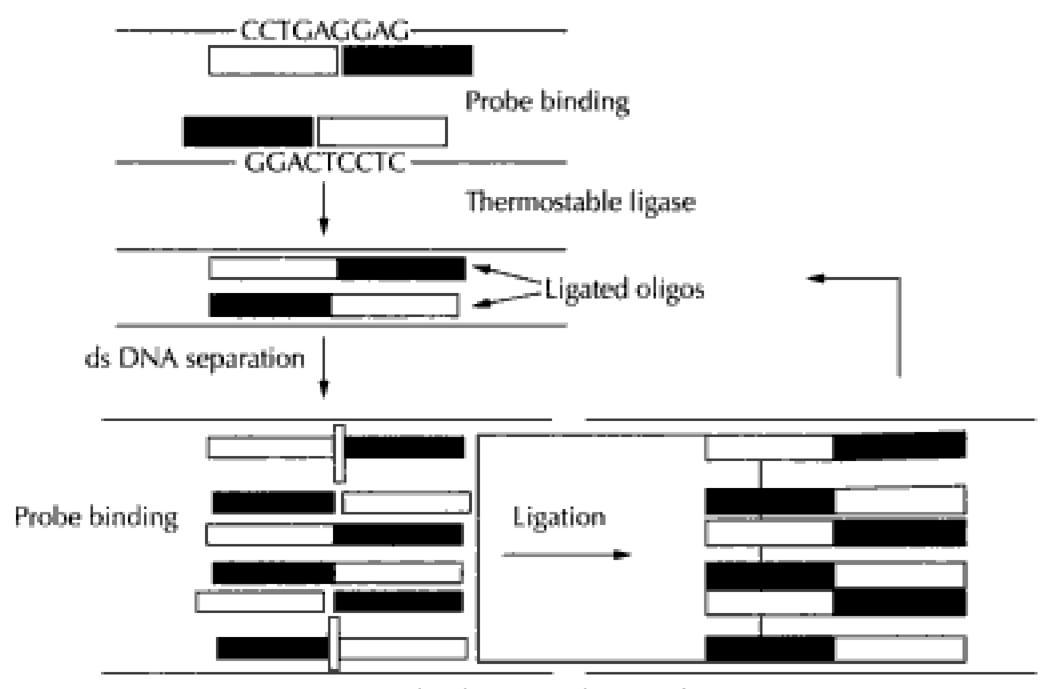



**Figure 8.** *Ligase chain reaction*

### d) Association PCR-séquençage

Grâce aux développements rapides des technologies de séquençage et à la baisse constante du prix des réactifs, il devient aujourd'hui possible de séquencer directement les produits de PCR. Dans le cas d'une mutation ponctuelle connue, il suffit donc d'amplifier la région supposée être mutée à l'aide d'amorces flanquant la zone à amplifier puis de séquencer les produits de PCR obtenus.
Cette technique n'est pas soumise aux aléas des hybridations et/ou des digestions enzymatiques. Elle est donc extrêmement fiable pour peu que la polymérase utilisée soit une polymérase à très faible taux d'erreur. La technique est largement automatisable tant dans la réalisation que dans l'interprétation des résultats (des logiciels spécifiques sont susceptibles de traiter et d'analyser les séquences amplifiées). Elle peut être employée pour dépister des mutations ponctuelles ou des polymorphismes.

## 2. Recherche d'une mutation ponctuelle inconnue

Le problème posé par la recherche d'une mutation inconnue responsable d'une maladie héréditaire a été simplifié par le développement des techniques d'amplification par PCR.

### a) Analyse des polymorphismes de conformation de l'ADN simple brin (*single strand conformation polymorphism*, SSCP)

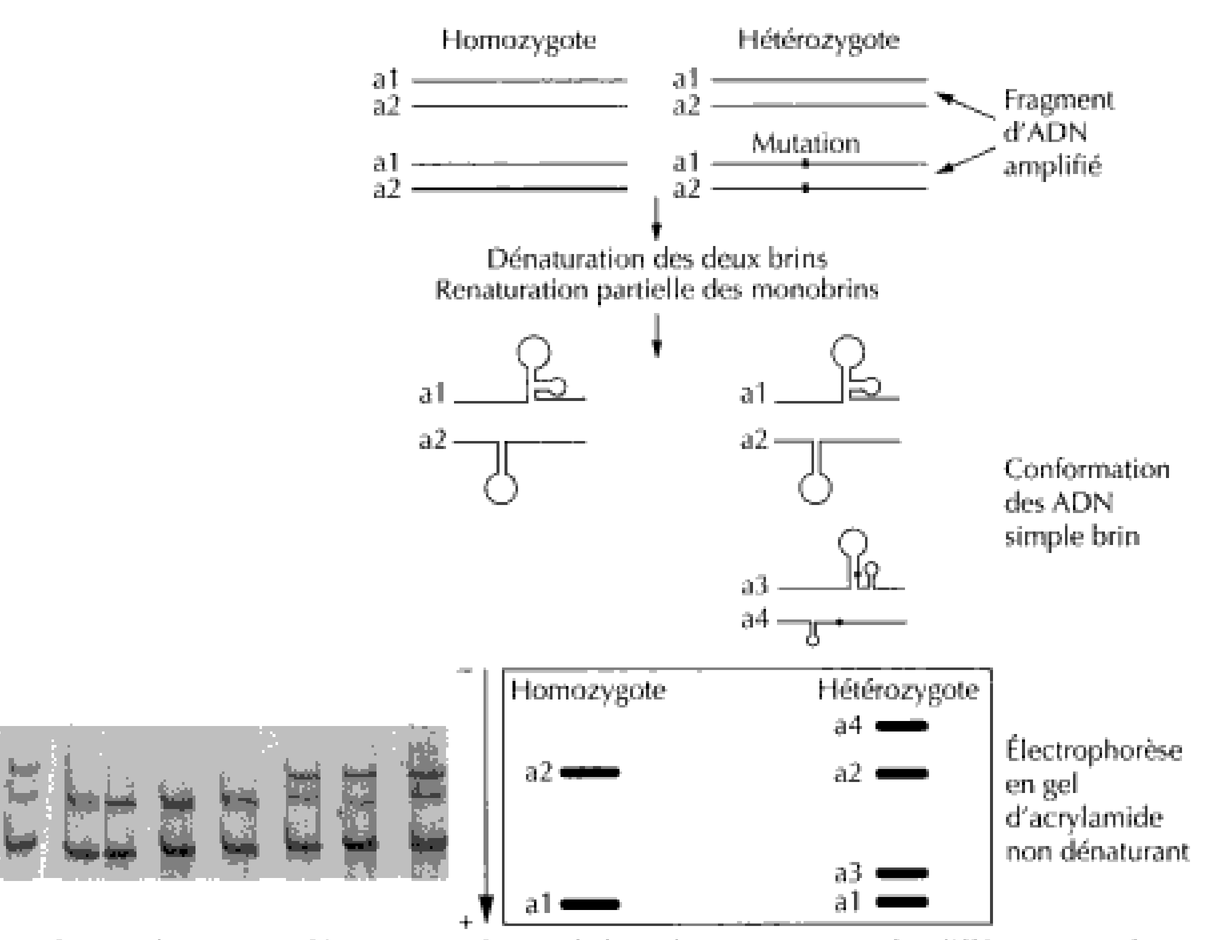
■ ***Principe de la technique***

La structure secondaire que prend un segment d'ADN simple brin est directement fonction de sa séquence. Généralement, une mutation ponctuelle au sein de cette séquence modifie suffisamment la structure secondaire pour qu'il en résulte une

modification de migration en électrophorèse. Cette propriété permet de mettre en évidence des mutations ponctuelles.
Dans un premier temps, la séquence (pas plus de 500 bp) dans laquelle on souhaite rechercher une mutation est amplifiée par PCR. L'ADN produit est marqué par l'utilisation de nucléotides radioactifs au cours de l'amplification Afin d'augmenter la spécificité de la technique, il est possible de réaliser une seconde PCR nichée à l'aide d'amorces plus internes que les précédentes. Ces amorces préalablement marquées à la T4 nucléotide kinase génèrent un amplimère marqué.
Le produit d'amplification est alors dénaturé par la chaleur pour séparer les deux brins d'ADN puis refroidi brutalement afin que ces deux brins restent séparés. Ces brins, qui sont ensuite séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide faiblement réticulé (en tampon neutre non dénaturant), vont prendre une conformation spécifique, dépendante de la séquence, conditionnant leur migration électrophorétique. Après autoradiographie, les résultats sont comparés avec ceux d'un ADN normal. Une fois dépistée, la nature de la mutation devra systématiquement être précisée par séquençage.

### ■ *Limites de la méthode*

La différence de migration entre ADN muté et ADN normal est souvent très faible, la mutation pouvant soit freiner, soit accélérer la migration. Il est donc nécessaire de traiter l'ADN normal dans des conditions les plus proches possibles de l'ADN muté pour ne pas générer de résultats faussement positifs. Le second inconvénient de la technique réside dans l'emploi de matériel radioactif.




**Dans des conditions non dénaturantes, le simple brin d'ADN peut prendre différentes conformations 3D selon la séquence de départ.**

**Figure 9.** Technique SSCP

### b) Électrophorèse en présence d'un gradient de dénaturant (*denaturing gradient gel electrophoresis*, DGGE)

#### ■ *Principe de la technique DGGE*

La température de fusion (Tm, *melting temperature*) d'un ADN est directement fonction de sa séquence. Une mutation ponctuelle qui la modifie entraîne donc inévitablement une modification de la Tm d'un domaine donné (domaine de fusion). Cette modification peut être mise en évidence par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide contenant un gradient linéaire d'agents dénaturants (urée + formamide). La dénaturation provoque, pour la séquence qui présente le domaine de fusion le moins stable, l'adoption d'une conformation simple brin qui va entraîner un ralentissement considérable de sa migration électrophorétique dans le gel (*fig. 10*). Lorsque la mutation est présente à l'état hétérozygote, les hétéroduplex formés sont facilement identifiables.

Cette technique très puissante permet de caractériser toutes les mutations. La nature de la mutation devra être précisée par séquençage.

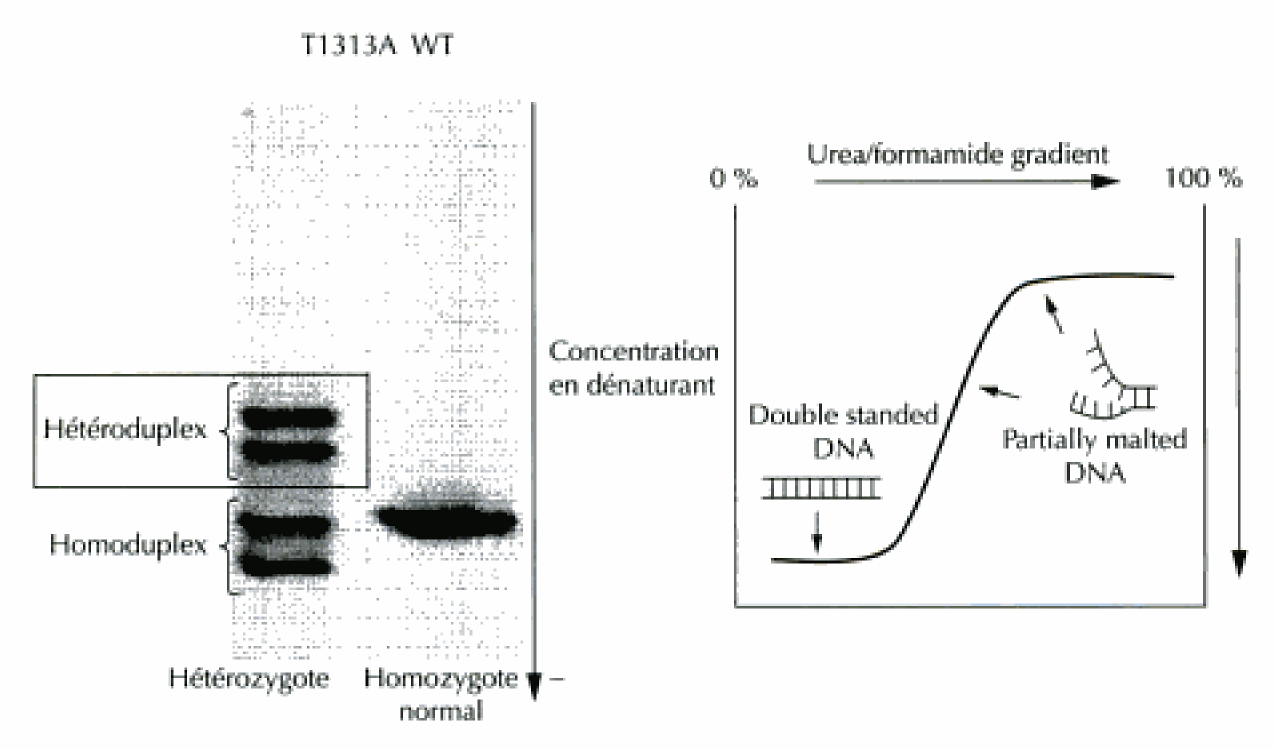



**Figure 10.** Technique DGGE

#### ■ *Avantages et limites*

Contrairement à la technique précédente, la technique DGGE ne nécessite pas de produits radioactifs. Son principal écueil réside dans la lourdeur de sa mise au point. Elle réclame en effet une analyse informatique poussée qui permet de déterminer exactement les conditions expérimentales. Il est de plus parfois nécessaire de sensibiliser la méthode lorsque la zone ne présente pas de domaine de fusion bien individualisé en ajoutant en 5' de l'amorce une répétition de résidus CC (trente à quatre-vingts nucléotides, GC clamp) dont le T, élevé contraste avec celui de la séquence à explorer.

Cette technique a été utilisée avec succès dans le dépistage des mutations du gène CFTR qui sont responsables de la mucoviscidose.

### c) Clivage chimique spécifique des mésappariements

Les mésappariements qui impliquent soit un résidu cytosine, soit une thymidine peuvent être mis en évidence par le tétraoxyde d'osmium à 4 % et l'hydroxylamine 2M qui les clivent spécifiquement. La mutation correspondante doit être séquencée. Cette technique reste peu employée en raison de la toxicité des produits utilisés.

### d) Méthodes chromatographiques : *denaturating high performance liquid chromatography* (DHPLC)

La DHPLC est une technique d'HPLC appliquée à l'analyse génétique : elle permet de détecter des anomalies (mutations ou polymorphismes) dans un fragment d'ADN double brin en séparant les homoduplex (fragments d'ADN double brin parfaitement appariés) des hétéroduplex (fragments d'ADN double brin présentant un ou plusieurs mésappariements). Elle met en œuvre une chromatographie en phase inversée avec couplage d'ions. L'affinité différentielle des homoduplex et des hétéroduplex pour la colonne permet de les séparer.

■ ***Phase stationnaire***

Elle est constituée de billes de polystyrène divinylbenzène sur lesquelles sont greffés des groupements alkyles C18. Ces billes de 2 nm de diamètre sont contenues dans une colonne. Les molécules d'ADN interagissent avec les billes par l'intermédiaire du TEAA (tampon de la phase stationnaire) qui est une molécule amphiphile. Elle permet le pontage entre les groupements alkyles des billes (3) (pôle hydrophobe) et les charges négatives des groupements phosphates des doubles brins d'ADN (pôle hydrophile).

■ ***Phase mobile***

Elle contient 0.1 M de triéthylamine (TEAA) et de l'acétonitrile (ACN). Le mélange de ces deux réactifs au niveau de la pompe permet de créer un gradient d'acétonitrile pendant l'analyse. L'acétonitrile est un solvant organique très hydrophobe. Il va permettre la libération de l'ADN de la phase fixe. Un gradient linéaire d'acétonitrile permet d'éluer à des temps différents les constituants de l'échantillon (homoduplex et hétéroduplex). Les molécules d'hétéroduplex sont éluées avant les molécules d'homoduplex car il y a moins de liaisons entre les bases.
Pour que le système puisse détecter la présence d'un mésappariement, il faut réaliser une dénaturation partielle du double brin d'ADN. Celui-ci est chauffé (55 à 65 °C), ce qui entraîne une dénaturation partielle responsable d'une modification de la structure spatiale de l'ADN. La température du four dans lequel est placée la colonne doit être déterminée au dixième de degré près selon le domaine de fusion étudié. Si celle-ci est trop élevée, les liaisons hydrogènes entre bases complémentaires sont rompues, l'ADN est alors sous forme simple brin et les mutations ne peuvent plus être détectées. Un logiciel intégré à l'appareil permet de déterminer la courbe de fusion ainsi que la température de réglage du four nécessaire à l'analyse des domaines de la séquence d'ADN.

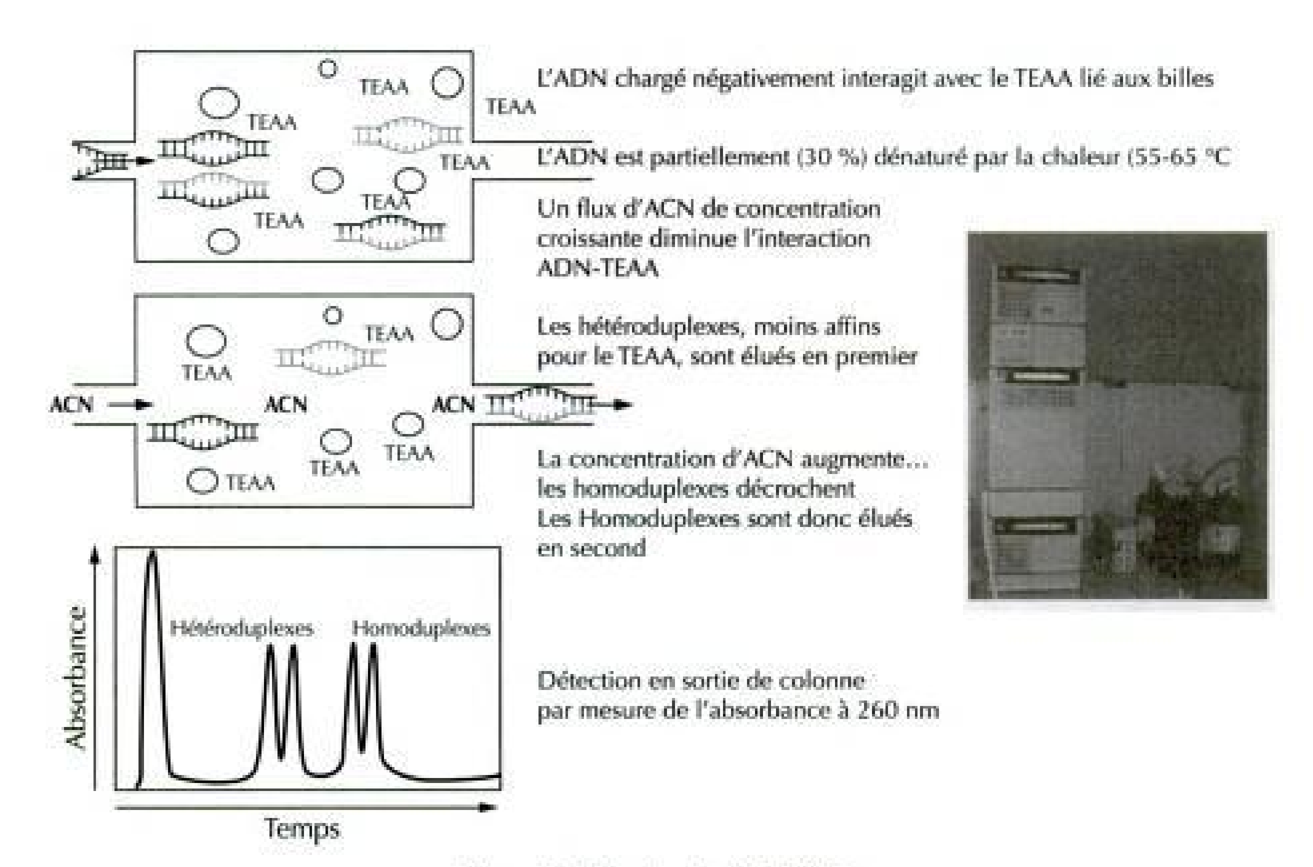



**Figure 11.** Principe de la DHPLC

## e) Séquençage

C'est actuellement la méthode la plus sûre puisqu'elle ne laisse théoriquement passer aucune anomalie. L'avancement du clonage total du génome humain associé au développement de techniques de séquençage de plus en plus performantes fait que cette technique devrait à terme supplanter toutes les autres techniques, en routine dans les laboratoires de biologie moléculaire, pour dépister des mutations. Les techniques de base sont actuellement fondées sur la mise en œuvre de procédures électrophorétiques utilisant des gels de polyacrylamide à haute résolution de séparation en conditions dénaturantes.

La détermination de la séquence d'un fragment donné consiste à générer tous les fragments se terminant par un A, T, G ou C suivant quatre réactions enzymatiques ou chimiques différentes. Les produits de ces quatre réactions sont ensuite déposés sur le gel dans des pistes adjacentes. La visualisation pourra se faire grâce à l'utilisation de fragments marqués radioactivement ou de manière fluorescente.

### ■ *Technique chimique selon Maxam et Gilbert*

Cette méthode consiste à modifier chimiquement et spécifiquement les bases d'ADN grâce à l'hydrazine, le diméthylsulfate et l'acide formique. La pipéridine est ensuite ajoutée au milieu réactionnel pour catalyser le clivage des bases modifiées : G avec DMS, G + A avec l'acide formique, T + C avec l'hydrazine et C avec hydrazine + NaCl. La séquence sera alors déduite des quatre réactions. Une amélioration de la technique de Maxam, appelée « séquençage multiplex », permet d'analyser quarante séquences différentes sur un seul gel de séquence. Ce type de technique est aujourd'hui tombé en désuétude.

## ■ *Technique enzymatique selon Sanger*

Cette méthode utilise une ADN polymérase capable de synthétiser le brin complémentaire d'un fragment d'ADN matrice. Cette polymérase va utiliser des 2'-3' didésoxynucléosides triphosphate (ddNTP) comme substrat. Le processus d'élongation débute en 5' à l'aide d'une amorce spécifique hybridée au brin matrice. Pour générer les différentes pistes, seul un des quatre ddNTP est incorporé successivement dans quatre milieux réactionnels différents. Lorsqu'un ddNTP est incorporé à l'extrémité 3', l'élongation est bloquée. Les produits de chaque réaction se terminant par ddATP, ddTTP, ddGTP ou par ddCTP sont fractionnés et déposés sur gel. À l'origine, ces deux techniques ne peuvent fonctionner qu'avec de l'ADN simple brin. Le plus souvent, afin d'avoir des séquençages de qualité, les deux brins à séquencer sont séparés et un monobrin est sous-cloné dans un phage monobrin. Aujourd'hui, avec l'amélioration des techniques, il est possible de se passer de sous-clonage et de séquencer directement les produits de PCR, par exemple.

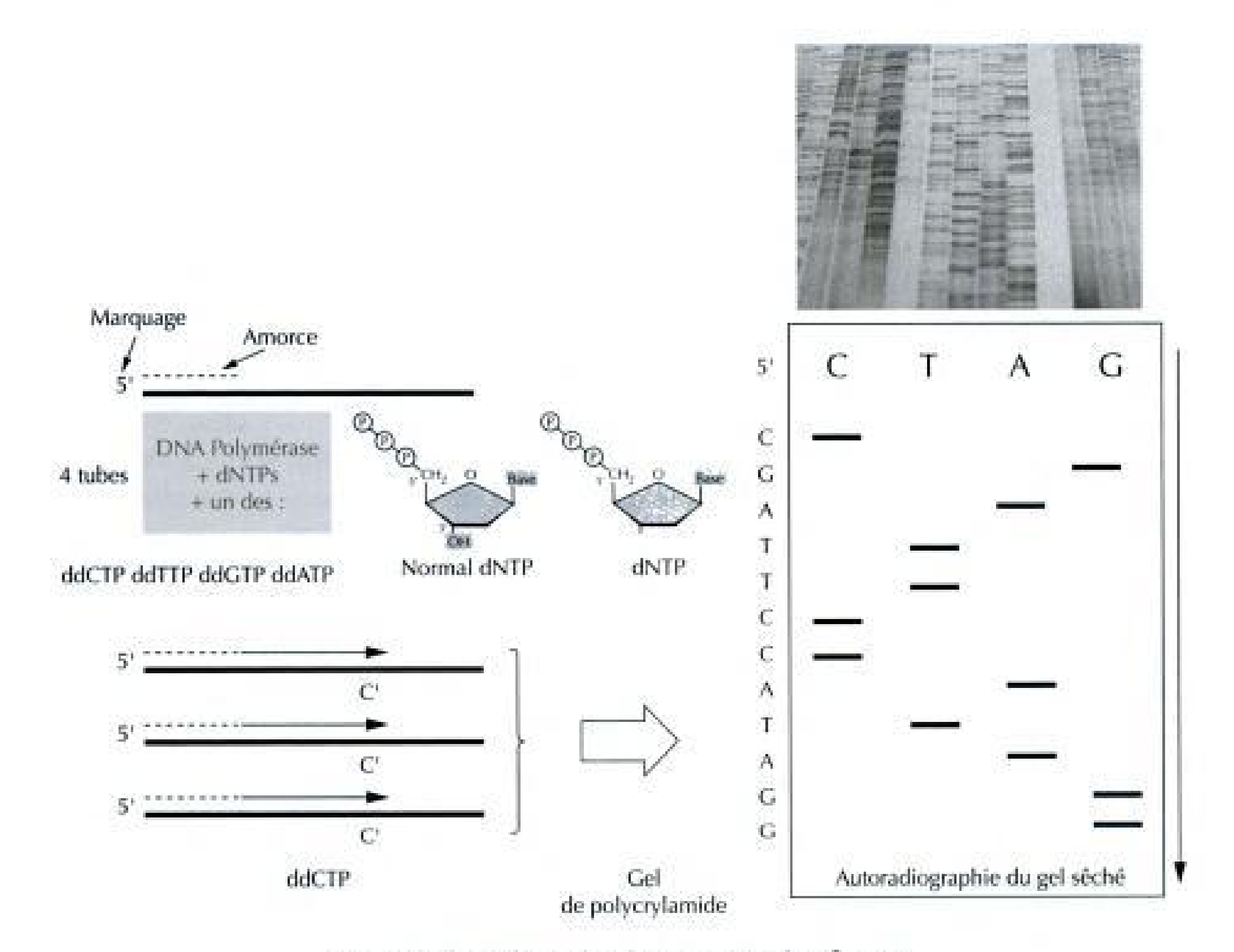



**Figure 12.** Technique de séquençage selon Sanger

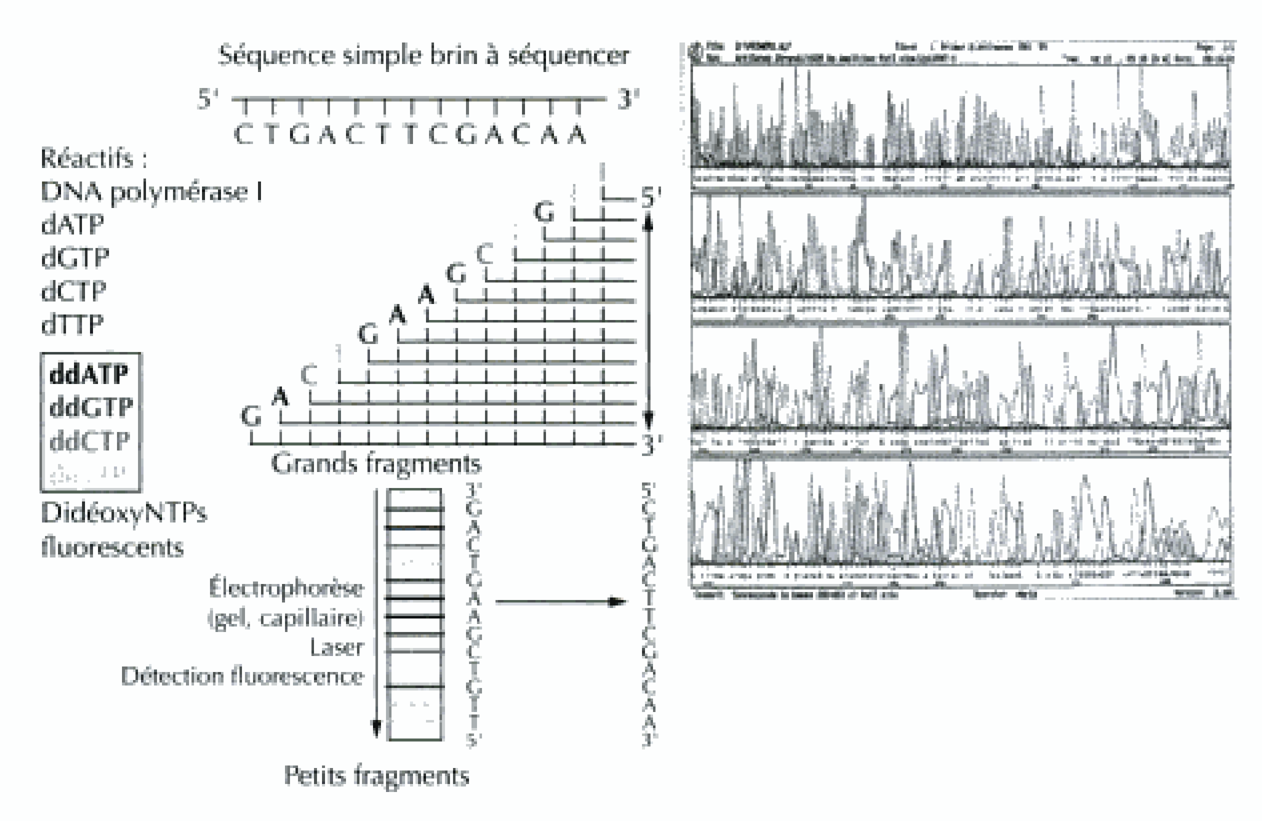



**Figure 13.** Séquençage automatisé haut débit

## ■ *Nouvelles technologies*

Les gros besoins en séquences des projets de séquençage de génomes entiers pour établir les cartes génétiques des différents chromosomes ont permis à la technologie de séquençage de progresser très rapidement. Le plus petit des chromosomes (chromosome Y) contenant 50 mégabases, le plus grand (chromosome 1) au-delà de 250 Mb, il était donc indispensable de se doter de techniques performantes et peu coûteuses (100 000 bases/jour, moins de 0,30 euro la base) pour séquencer de si grands fragments.

Les méthodes de seconde génération, seules utilisées en routine aujourd'hui et toutes directement inspirées de la technique de Sanger, permettent de gagner un facteur 10 en vitesse et de baisser significativement les coûts. Ce sont des technologies utilisant principalement des techniques électrophorétiques en capillaire à haut voltage (96 capillaires peuvent fonctionner en parallèle) qui augmentent la résolution de séparation des fragments, qui peuvent être couplées à des techniques de détection ultraperformantes (comme la spectroscopie ionique pour détecter des isotopes stables) et qui sont soutenues par de puissants logiciels informatiques.

Les méthodes de troisième génération, qui devraient permettre d'augmenter très fortement l'efficacité, sont des techniques en développement qui tendent à se passer de gels. Elles devraient faire appel à des technologies comme :

- la cytométrie de flux avec repérage de la fluorescence émise par les bases marquées ;
- la lecture directe de la séquence en base du brin d'ADN par microscopie atomique ;
- l'analyse par spectrométrie de masse de la séquence d'ADN ;
- le séquençage par hybridation à des nucléotides marqués de séquence courte connue ;

- le pyroséquençage où l'on utilise le fait que la polymérase, lorsqu'elle allonge le brin, produit à chaque incorporation un pyrophosphate (PPi). Ce pyrophosphate est alors transformé en ATP par une ATP sulfurylase. Cet ATP produit sert à l'oxydation de la luciférine par la luciférase qui va produire des photons qui seront comptabilisés. En fonction de la base introduite, un signal est émis. Il est donc possible de repérer progressivement la nature des bases incorporées.

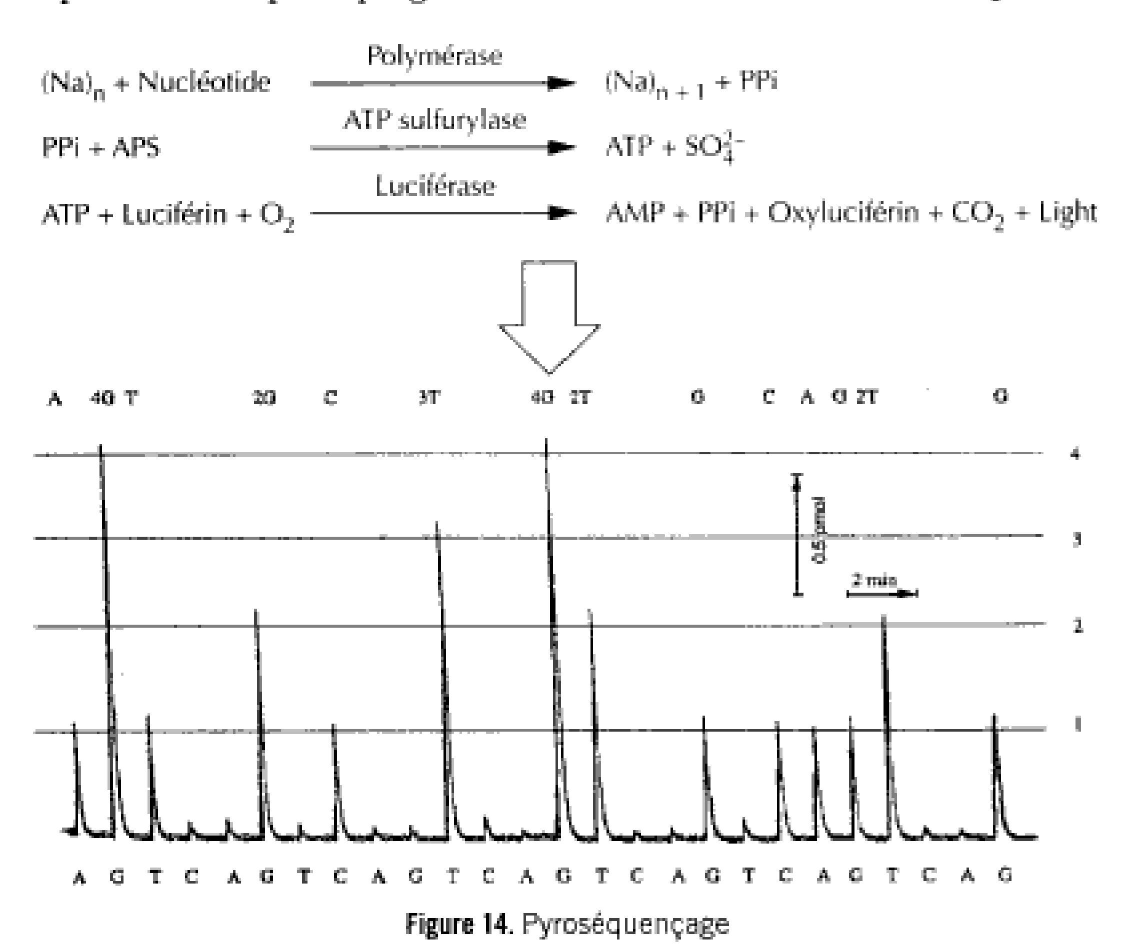



**Figure 14.** Pyroséquençage

## 3. Analyse indirecte par analyse familiale de la cotransmission de marqueurs moléculaires de l'ADN

Il arrive souvent que le diagnostic direct ne soit pas possible. Il s'agit dans ce cas d'adopter une stratégie indirecte qui suppose de disposer dans le voisinage du gène à analyser d'une ou plusieurs sondes reconnaissant un marqueur moléculaire génétique. En effet, l'ADN génomique humain est caractérisé par son polymorphisme génotypique, c'est-à-dire l'existence de variations stables capables d'être transmises à la descendance. Ces variations génotypiques expliquent en partie la grande diversité phénotypique des individus. On distingue différents polymorphismes :

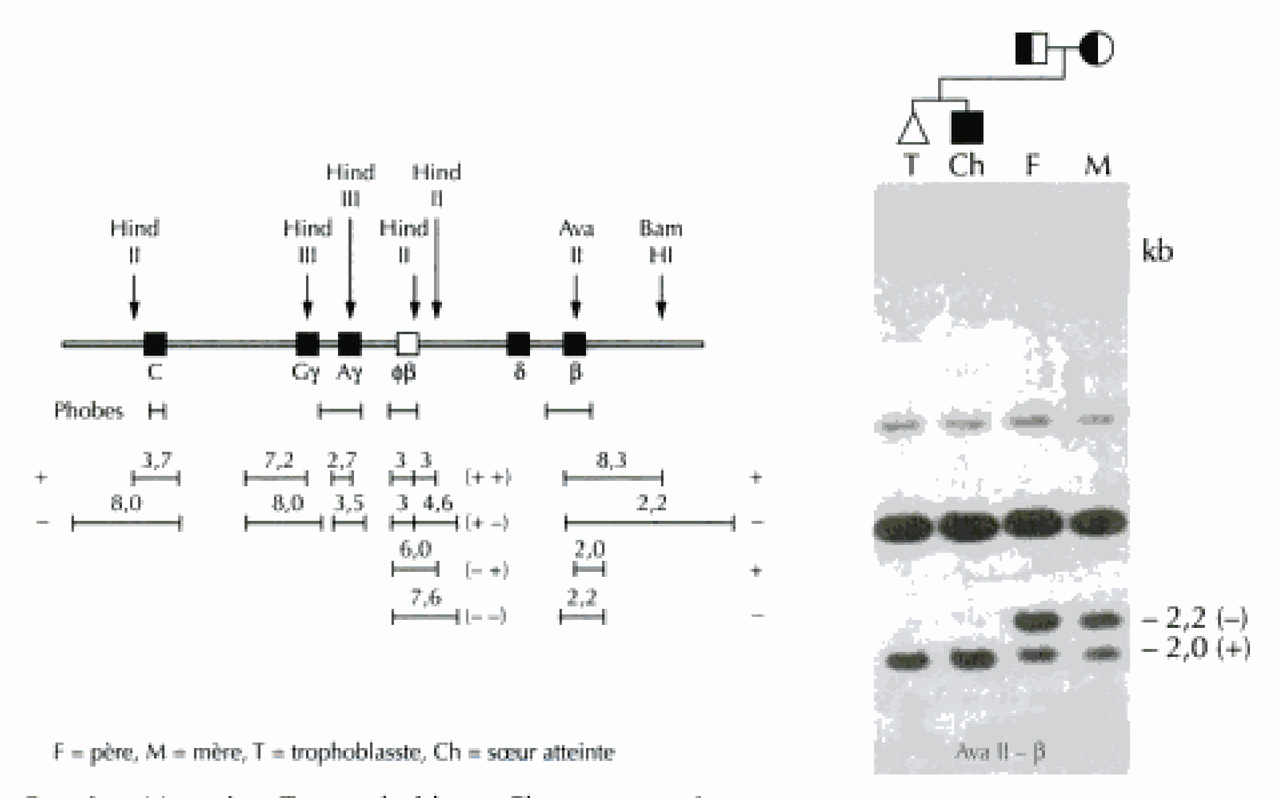
- les polymorphismes de restriction qui intéressent des variations ponctuelles de séquence touchant un site de restriction ;
- les polymorphismes de répétition qui se distinguent entre eux par le nombre de copies de séquences répétées :
  - si le motif de base est supérieur à dix nucléotides, ces séquences sont appelées « minisatellites » ou « VNTR » (*variable number of tandem repeats*) ;
  - si le motif de base est compris entre un et cinq nucléotides, elles sont appelées « microsatellites » ou « STR » (*short tandem repeats*).

Les principales applications concernent :

- le diagnostic des anomalies de l'ADN constitutionnel responsables de maladies héréditaires (diagnostic prénatal, détection des hétérozygotes) ;
- le diagnostic des anomalies de l'ADN somatique responsables de prolifération cellulaire monoclonale maligne.

### a) Polymorphismes de restriction (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP)

De nombreux sites de restriction jalonnent les molécules d'ADN génomique. Certains d'entre eux sont invariants ou permanents (quel que soit l'individu étudié), d'autres sont facultatifs ou occasionnels. Ces sites occasionnels sont appelés « RFLP » parce qu'ils vont induire à l'endroit du génome où ils résident (locus) un polymorphisme de longueur des fragments de restriction. Bien entendu, les RFLP peuvent se trouver soit dans des régions codantes du génome, soit dans des parties introniques ou non codantes. Ils n'ont en eux-mêmes aucune signification fonctionnelle. Un RFLP possède toutes les caractéristiques d'un gène. Il présente un locus, l'existence de deux formes alléliques (présence + ou absence –) et la ségrégation à la méiose (50 % de gamètes + et 50 % de gamètes – pour un individu +/–). L'étude des RFLP a été initialement réalisée par Southern blot avec des sondes ADNc (exoniques ou juxta-exoniques) puis ADNg (exoniques, introniques, extragéniques). Elle est maintenant réalisée par séquençage des produits de PCR obtenus à l'aide d'amorces flanquant le site de restriction à étudier.




F = père, M = mère, T = trophoblaste, Ch = sœur atteinte.
Alors que les deux parents apparaissent clairement hétérozygotes, le trophoblaste analysé révèle que le fœtus à tester est porteur du même génotype que sa sœur malade.

**Figure 15.** Diagnostic prénatal de la β-thalassémie utilisant un RFLP AvaII

### b) Mini- et microsatellites

La recherche systématique de polymorphismes moléculaires de l'ADN a abouti à la découverte de polymorphismes de type minisatellites et de type microsatellites. Il s'agit donc de motifs nucléotidiques (deux à quelques paires de bases) répétés en tandem n fois, n étant un entier plus ou moins grand. Il y aura donc, par digestion d'une enzyme de restriction à deux sites invariants bornant cette séquence, autant de fragments de tailles différentes qu'il y a de valeurs n possibles de la répétition d'un individu à l'autre.
Le nombre élevé de génotypes possibles rend peu probable la possibilité que deux individus soient porteurs du même génotype. Les plus nombreuses et les plus utilisées des répétitions sont les répétitions CA ou TA.
C'est ce type de méthode qui est utilisée pour diagnostiquer la maladie du X-fragile (expansion de triplet (CAG)n dans le promoteur du gène FMR1) et la dystrophie myotonique (expansion de triplet (CTG)n dans le gène codant pour la myotonine protéine kinase).

## B. Analyse de l'ARN messager

Contrairement à l'analyse de l'ADN génomique, celle qui concerne l'ARNm est largement plus délicate. En effet, l'ARNm présente :

- une grande vulnérabilité vis-à-vis des RNases, enzymes ubiquitaires et difficiles à inactiver complètement ;
- une grande complexité et une spécialisation cellulaire stricte ;
- une très faible abondance pour certains d'entre eux.

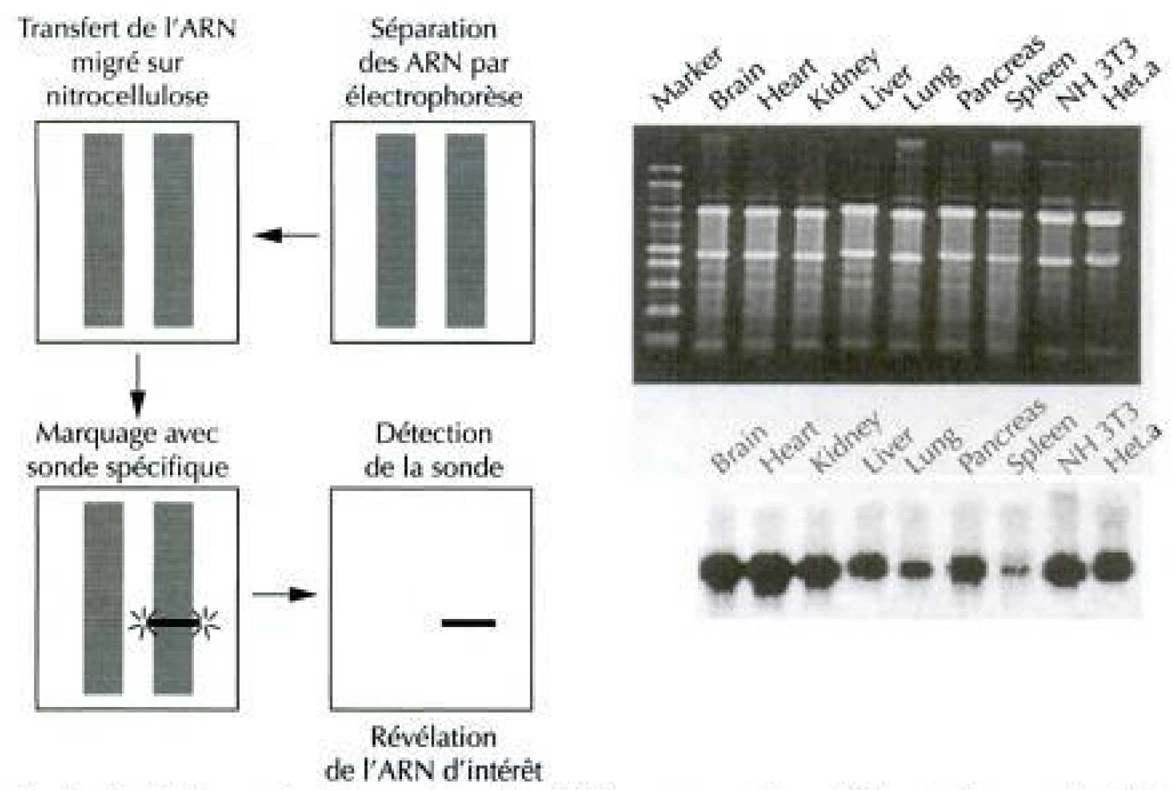
Compte tenu de l'expression variable des ARN messagers selon les tissus (sauf pour les gènes dits « domestiques » qui présentent une expression ubiquitaire dans tous les tissus), les analyses vont donc s'avérer conditionnées par la spécificité tissulaire. Il conviendra donc de choisir avec soin le tissu source. Il existe cependant une transcription illégitime qui correspond à la transcription à bas bruit de gènes, théoriquement tissus-spécifiques, dans toutes les cellules. Cette transcription est accessible par l'analyse par PCR.
La plupart du temps, l'analyse des ARN se borne à une analyse des ARN totaux. Il s'avère parfois intéressant de pratiquer un enrichissement en ARN polyadénylés, afin d'analyser les ARN réellement codants. Les principales méthodes d'analyse qualitative des ARN sont les suivantes :

### 1. Northern blot

La méthode de *Northern* (par opposition humoristique au Southern blot, appelé ainsi par le biologiste Edwin Southern qui a aussi inspiré le nom « Western blot » qui fait référence aux séquences en acides aminés des protéines) comprend une première étape de séparation des ARN par électrophorèse en gel d'agarose dénaturant pour abolir la structure secondaire qui pourrait gêner la migration et l'hybridation. Ensuite, les ARN sont transférés sur filtre et hybridés avec une sonde marquée. L'inconvénient principal de cette méthode est son manque de sensibilité, mais cette technique permet :

- d'objectiver la présence d'un ARN ;
- d'explorer les intermédiaires de maturation de cet ARN ;

- d'apprécier la taille des ARNm et donc de mettre aisément en évidence l'existence d'un épissage alternatif avec des ARN de taille différente.




La photo de droite montre l'expression d'un ARN messager dans différents tissus après électrophorèse (en haut), puis hybridation et révélation avec une sonde spécifique (en bas). Cet ARN apparaît exprimé dans la plupart des tissus mais est surexprimé dans le cœur et sous-exprimé dans la rate et les poumons.

**Figure 16.** Principe du Northern blot

Il existe des variantes type dot blot où l'ARN est fixé sur la membrane sans électrophorèse initiale.

| Scheme | Lanes | EUB 338 | ALF 1b | BET 42a | GAM 42a | HGC |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 2 3 4 | (fal)-soil | | | | | |
| 5 6 7 8 | (fal)-soil | | | | | |
| 1 2 3 4 | (fal)-soil | | | | | |
| 5 6 7 8 | (fal)-soil | | | | | |
| 1 2 3 4 | (fal)-soil | | | | | |
| 5 6 7 8 | (fal)-soil | | | | | |
| | Specificity | | | | | |
| | Conc. Standart | | | | | |
| | Used strains | Used strains | Agr. tumefaciens | Burkh. gladioli | Ps. fluorescens | Clv. michiganense |

**Figure 17.** Dot blot réalisé pour apprécier le niveau d'expression de différentes souches bactériennes dans différents sols

## 2. Cartographie à la nucléase S1

L'exploration par la nucléase S1 permet de mettre en évidence des différences entre la séquence d'une sonde d'ADN génomique et celle d'un ARNm (recherche de mutations ponctuelles). La sonde ADN marquée est hybridée avec l'ARN à tester

dans des conditions telles que seuls les hybrides ADN-RNA se forment. Le RNA messager correspondant au gène s'hybride avec les parties codantes de l'ADN génomique, les parties non codantes restant sous forme monobrin.
On utilise alors la propriété de certaines enzymes qui ne clivent que les séquences d'acides nucléiques monocaténaires. Un mésappariement, même partiel, crée une zone vulnérable vis-à-vis de ces enzymes. Leur action se manifeste par un raccourcissement de la sonde marquée, visualisée par migration dans un gel dénaturant. La nucléase S1 clive seulement les séquences non appariées sur plus de trois nucléotides. Pour apprécier des mésappariements plus petits, on utilisera la RNAse A qui peut révéler certains mésappariements d'une seule base. Ce type de méthodologie est également utilisé pour mettre en évidence aussi bien des messagers minoritaires que pour en déterminer l'extrémité 5'.

## 3. Reverse transcriptase-PCR (RT-PCR)

La Taq polymérase ne pouvant utiliser l'ARN comme matrice, il est nécessaire de réaliser une étape intermédiaire où l'ARN est transformé en ADN complémentaire (ADNc) utilisable comme substrat de la Taq polymérase.
On réalise donc une transcription inverse du brin d'ARN en utilisant une ADN polymérase ARN dépendante (la transcriptase inverse) et des amorces (soit de l'oligo-dT se fixant sur la queue de poly A, soit un mélange d'hexanucléotides synthétisées au hasard, soit l'amorce en position 3' utilisée pour la PCR où, dans ce dernier cas, seul l'ARN d'intérêt est synthétisé). L'ADN complémentaire servira alors de matrice pour l'amplification en PCR.
Cette technique permet l'amplification considérable des ARN messagers et l'analyse complète de leur séquence (les produits de PCR peuvent en effet être facilement séquencés).

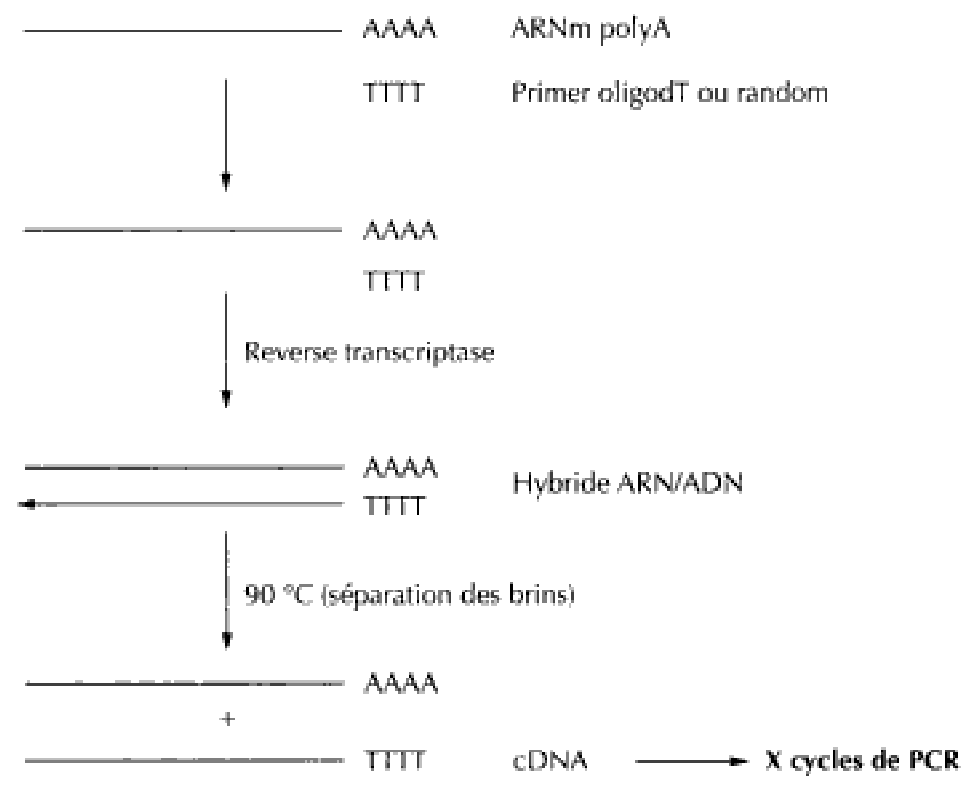



**Figure 18.** Préparation d'un ADN complémentaire à partir d'un ARN

# III. Analyse quantitative de l'expression des gènes

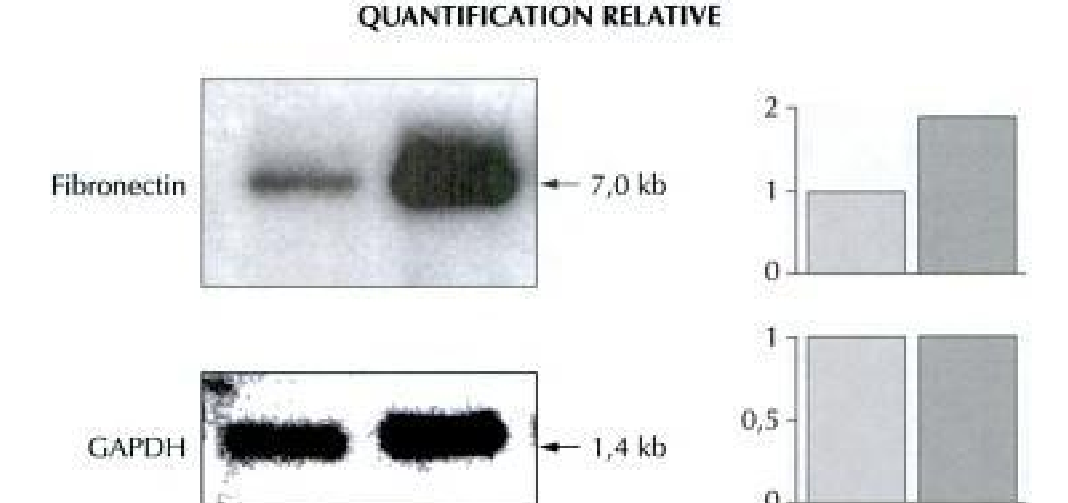
Au niveau de l'ADN, on s'intéressera surtout à l'analyse quantitative de l'expression génique pour apprécier l'intensité d'une variation de séquence (le plus souvent une délétion ou une amplification). En estimant le nombre de copies amplifiées d'un gène par rapport à un témoin, il est possible d'apprécier une diminution ou une amplification du signal. Les délétions complètes homo- ou hémizygotes se traduiront par l'absence totale de signal. En revanche, les délétions complètes hétérozygotes seront plus difficiles à interpréter et le recours à un dosage génique sera indispensable. Pour les gènes autosomiques uniques, ce dosage génique doit en principe varier de 50 % par copie haploïde délétée.
Pour l'ARN, on cherchera surtout à quantifier la présence d'ARN dans différents milieux (sang, etc.) ou tissus. Ce type de technique est très employé en cancérologie pour suivre la maladie résiduelle après traitement ou avec la survenue de récidive (par exemple, quantification des transcrits bcr-abl dans la leucémie myéloïde chronique). Les principales techniques de mesure sont les suivantes :

## A. Dot blot, slot blot

L'hybridation sur tache (dot blot, slot blot) permet d'apprécier la présence et aussi la quantité d'un acide nucléique (ADN, ARN). Elle n'est valable que si la sonde utilisée est unique et donc si aucune hybridation croisée ne vient interférer avec le résultat final.
Les ARN sont fixés sur membrane et celle-ci est hybridée avec une sonde complémentaire monobrin marquée [pour l'ADN, sonde ADN ou oligonucléotidique ; pour l'ARN, sonde d'ADN dénaturé (cDNA) ou oligonucléotide antisens ou ARN antisens].
L'intensité du signal est mesurée par analyse densitométrique du signal autoradiographique. Cette intensité pour le gène considéré est généralement comparée à une gamme d'étalonnage. Il est donc possible de connaître précisément le nombre de copies du gène présent dans l'échantillon.

## B. Southern blot, Northern blot

Ces deux techniques peuvent, au même titre que le dot blot, permettre de quantifier les fractions objectivées lors de l'autoradiographie. Pour les ARNm, il devient même possible de quantifier précisément les isoformes d'épissage et donc de comparer des tissus entre eux.




Le gène codant pour la GAPDH sert de référence (la GAPDH est un gène domestique ubiquitairement distribué dont le niveau d'expression est considéré constant dans les tissus).

**Figure 19.** Quantification des ARNm codant pour la fibronectine par Northern blot

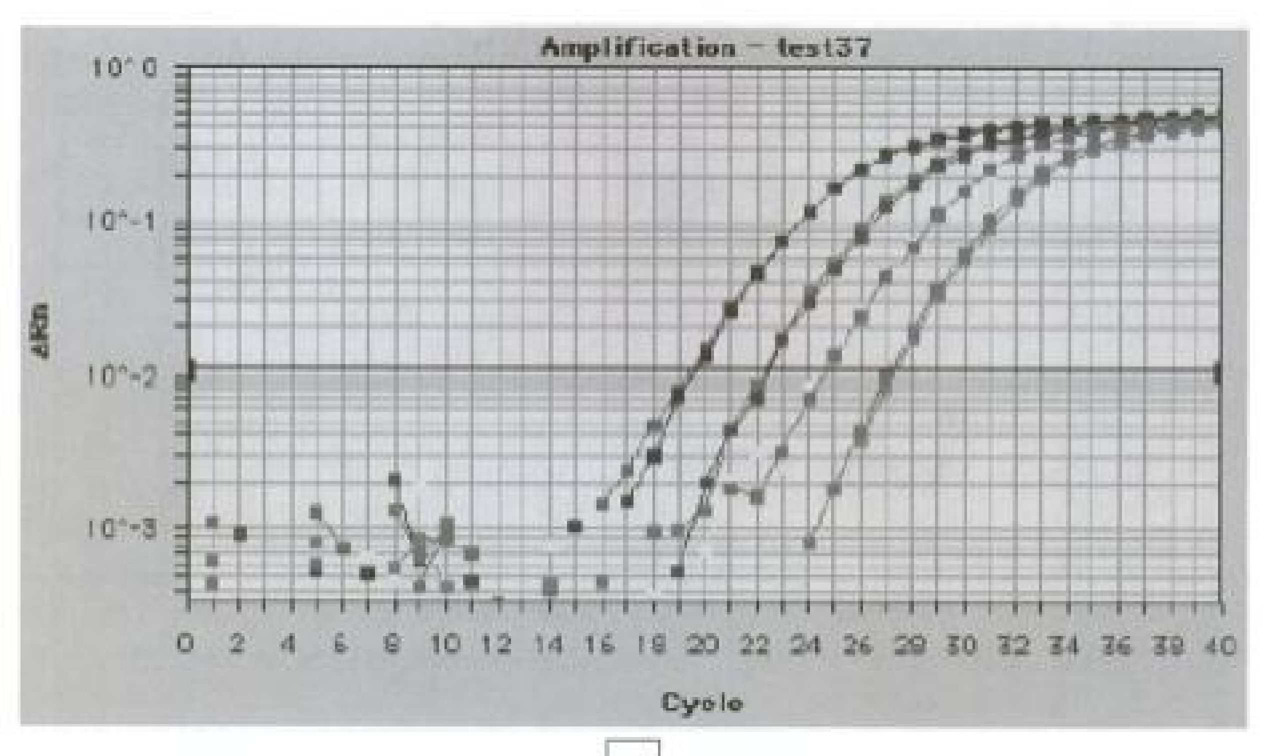
## C. PCR quantitative

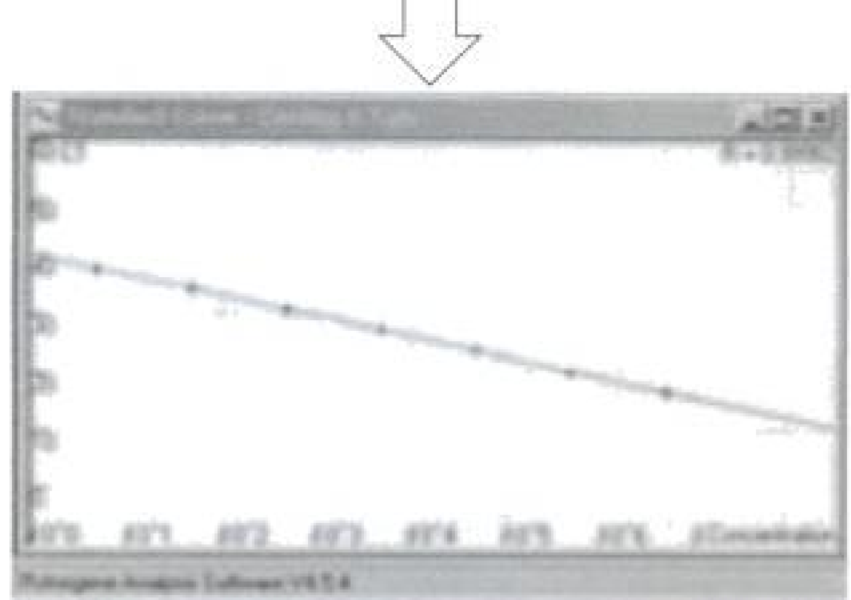
Théoriquement, la PCR peut permettre de mesurer le nombre de copies de la séquence cible dans un échantillon d'ADN (ou même d'ARN). En réalité, il est extrêmement difficile de réaliser cette détermination qui reste le plus souvent peu fiable et peu précise.

Les premières techniques pour optimiser la PCR quantitative conventionnelle, afin de diminuer les variations entre les tubes, ont utilisé un compétiteur interne ayant la même composition en bases mais qui est plus long ou plus court de quelques bases que la séquence à mesurer. Dans ce cas, les amorces utilisées entreront en compétition avec les deux cibles (sauvage, à doser, et modifiée, apportée en quantité connue). Après coamplification de la cible avec une gamme de compétiteur, la quantité de cible est considérée comme égale à la quantité de gène à doser lorsqu'une équivalence d'amplification entre les deux cibles sera objectivée par une bande de même intensité sur le gel. Dans tous les cas, le nombre de cycles d'amplification utilisés sera faible de manière à rester dans la phase exponentielle d'amplification.

Ces techniques compétitives se sont révélées lourdes à gérer, en particulier pour les RT-PCR quantitatives pour lesquelles il fallait disposer d'un ARN étalon modifié. Cet ARN exogène, nécessaire pour s'affranchir des variations de rendement de la rétrotranscription, est le plus souvent très instable. Il peut donc être lui-même source de variations.

L'amélioration des techniques de PCR, notamment l'avènement de techniques utilisant la fluorescence émise par une sonde pour suivre en temps réel la formation d'amplimères, a permis de disposer de techniques plus reproductibles pour quantifier les acides nucléiques.



L'utilisation de la dilution d'un standard dont les quantités sont connues permet d'établir une courbe de calibration servant de référence pour quantifier l'ARN messager dans un tissu donné.

**Figure 20.** PCR quantitative

## IV. Cas particuliers des techniques à très haut débit

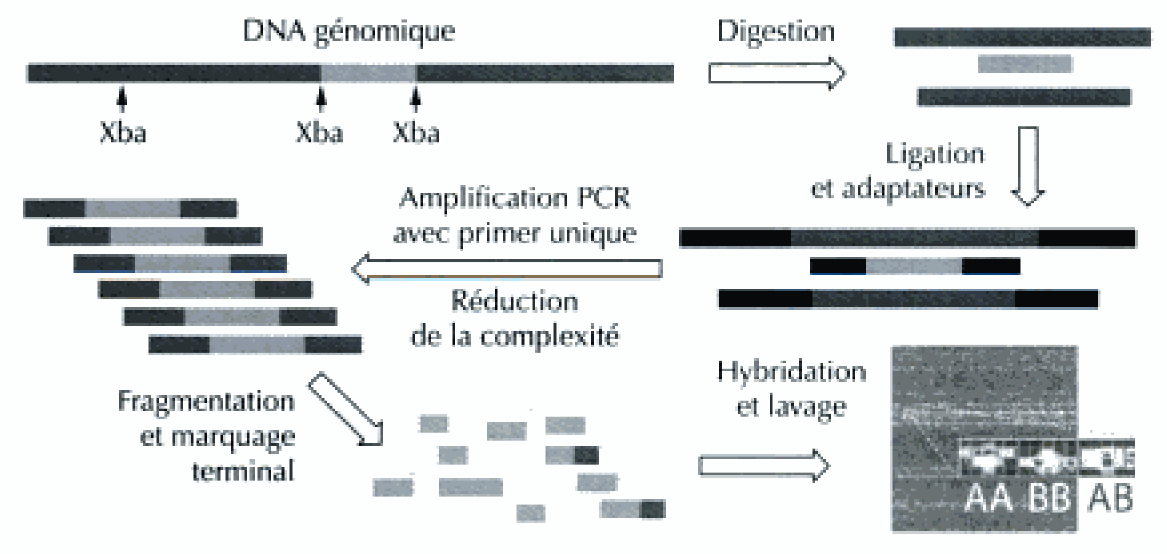
Leur objectif n'est pas de détecter de manière précise une variation de séquence ponctuelle (qu'il s'agisse d'une mutation isolée ou d'une petite délétion) mais d'analyser la globalité d'un génome (analyse de l'ADN) ou de ses produits (analyse des ARN synthétisés). Des anomalies ponctuelles peuvent apparaître dans la diversité des résultats engendrés. Le contexte clinique ou de recherche dans lequel l'analyse a été réalisée amènera à renseigner plus précisément en utilisant les techniques précédemment décrites.

Quel que soit leur objectif (ADN ou ARN), ces techniques utilisent les principes de base couramment employés pour des analyses plus précises : amplification des acides nucléiques, hybridation des acides nucléiques.

- Les objectifs d'une puce à ADN (puce à SNP, *single nucleotide polymorphism*, par exemple) sont encore du domaine de la recherche (génomique). Ils visent, dans un cadre nosologique très précis, à déterminer les variants de séquences (SNP) afin d'identifier des groupes de SNP communs à une situation particulière (trait génétique lié au BMI – *Body Mass Index* ou IMC, indice de masse corporelle –, l'aptitude à l'effort bref ou prolongé, etc.) ou à une pathologie (susceptibilité à une maladie, une infection, etc.).
- Les objectifs d'une puce à ARN consistent à évaluer précisément le répertoire d'ARN (transcriptome) exprimés par un type cellulaire, un tissu, un organe dans des conditions définies à un instant donné. Là encore, ils peuvent servir dans un cadre nosologique précis à déterminer les éléments caractéristiques d'un état donné (mise en évidence d'une réponse à une thérapie, établissement de la carte d'identité fonctionnelle d'une tumeur par rapport à celle du tissu sain, etc.).

D'immenses progrès technologiques ont été réalisés ces dernières années quant aux méthodes de génomique et de transcriptonique. Stimulées par la connaissance du génome, elles permettent d'accroître la sensibilité et la capacité de traitement. Ainsi, la possibilité d'amplifier à souhait les acides nucléiques offre une grande flexibilité et permet sans cesse de repousser les limites.

Les microarrays sont un outil qui accorde une vision globale, mais ces technologies encore très onéreuses ne sont aujourd'hui utilisées de façon courante qu'à l'occasion de vastes études visant à définir précisément une cible particulière ou une voie de signalisation montrant une importance clinique ou physiologique dans le cas étudié. Une fois cette étape de criblage effectuée, les techniques conventionnelles sont appliquées pour étudier plus finement le phénomène.




Seulement 250 ng d'ADN génomique par puce sont requis comme matériel de départ. L'ADN est digéré par une enzyme de restriction et lié à des adaptateurs. Une amorce générique reconnaissant la séquence d'adaptateurs est utilisée pour amplifier sélectivement les fragments de la PCR dans un certain intervalle de tailles. L'ADN amplifié est fragmenté, marqué et hybridé sur la puce.

**Figure 21.** Principe des puces à SNP

## L'essentiel de la question

Les variations de séquence des acides nucléiques concernent soit l'ADN, soit l'ARN et peuvent intéresser aussi bien des grandes parties du génome que toucher une base unique à la faveur d'une mutation ponctuelle. À côté de cet aspect purement qualitatif, l'amplification de certains gènes, à l'origine de différents processus néoplasiques, devra être appréciée à l'aide de techniques quantitatives. Les techniques à mettre en œuvre vont donc devoir répondre à ces différents aspects exploratoires. Toutes sont fondées sur deux propriétés des acides nucléiques :

- l'hybridation, c'est-à-dire la capacité qu'ont deux séquences complémentaires de s'associer spécifiquement entre elles ;
- la réplication, c'est-à-dire la propriété que possède l'ADN de pouvoir être dupliqué, une molécule d'ADN engendrant sous l'action de polymérases deux molécules filles rigoureusement identiques à la molécule de départ.

La première propriété a servi de base à des méthodes historiques comme le Southern blot pour l'ADN et le Northern blot pour l'ARN. La seconde est le fondement de toutes les techniques d'amplification élective *in vitro* (PCR pour l'ADN, RT-PCR pour l'ARN).

L'utilisation des techniques d'amplification a révolutionné l'analyse des acides nucléiques puisqu'il devient possible à partir d'un petit échantillon biologique d'amplifier exponentiellement la partie à analyser, pour peu que celle-ci soit connue. Couplées à des méthodes de séquençage de plus en plus fiables, performantes et peu coûteuses, il devient possible de séquencer base après base de très grandes parties du génome. Cette approche permet non seulement d'analyser des altérations portant sur des gènes bien identifiés, mais aussi de découvrir d'autres gènes qui sont autant de cibles pour des maladies génétiques constitutionnelles ou somatiques.

### *Pour en savoir plus*


- Kaplan J.C., Delpech M. *Biologie moléculaire et médecine*. Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 1993.
- Maniatis T., Sambrook J., Fritsch E.F. *Molecular biology, a laboratory manual*, 2e éd. Plymouth (Royaume-Uni) Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991.
- Ameziane N., Bogard M., Lamoril J. *Principes de biologie moléculaire en biologie clinique*. Paris, Elsevier, « Campus référence », 2006
- Sites Internet dédiés aux techniques de biologie moléculaire :
- http://www.protocol-online.net/molbio/PCR
- http://www.ornl.gov/TechResources/Human-Genome/publicat/primer
- http://www.pasteur.fr/recherche/BNB/
- Et bien d'autres à découvrir…

# Régulation de l'expression des gènes codant les protéines

B. PARFAIT, D. VIDAUD
Inserm U745, Génétique et biothérapie des maladies dégénératives et prolifératives du système nerveux, Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques, Université René-Descartes, Paris.

*Certains gènes sont exprimés dans pratiquement tous les types de cellules car ils constituent un élément clé requis pour le fonctionnement général de la cellule comme la synthèse protéique, la production d'énergie... De tels gènes sont appelés « gènes de ménage » (housekeeping genes). En revanche, de nombreux gènes présentent des profils d'expression tissu-spécifiques. Certains gènes ne sont exprimés que dans un type de cellule en fonction des besoins, par exemple, le gène HBB codant la β-globine n'est exprimé que dans les cellules érythroïdes.*
*L'expression des gènes peut également être restreinte dans le temps, par exemple à une certaine étape du développement, à certains stades de la différentiation cellulaire, du cycle cellulaire. L'expression d'un gène peut aussi être induite par des signaux extracellulaires ou différents facteurs de l'environnement.*
*Différents mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression des gènes sont présentés dans cet exposé.*

# I. Rappel sur la structure d'un gène

Il n'existe pas de structure définie d'un gène mais la *figure 1* est le modèle le plus fréquent. Le gène commence en 5' par une séquence non transcrite, dont la présence est nécessaire pour que la transcription s'effectue quantitativement et qualitativement de manière normale. Ces séquences peuvent être très éloignées. Vers – 100 par rapport au site d'initiation de la transcription, commence la région promotrice où se fixe l'ARN polymérase II. Vers – 70 à – 80 se trouve très souvent une séquence CAAT où se fixent des facteurs protéiques de transcription. Vers – 30, on retrouve (sauf pour les gènes de ménage à expression ubiquitaire) la TATA box où se fixe le complexe TFII D interagissant avec d'autres facteurs de transcription et l'ARN polymérase II. Si elle est délétée, le taux de transcription est diminué et la fidélité du point d'initiation de la transcription est perdue. Vient ensuite le site d'initiation de

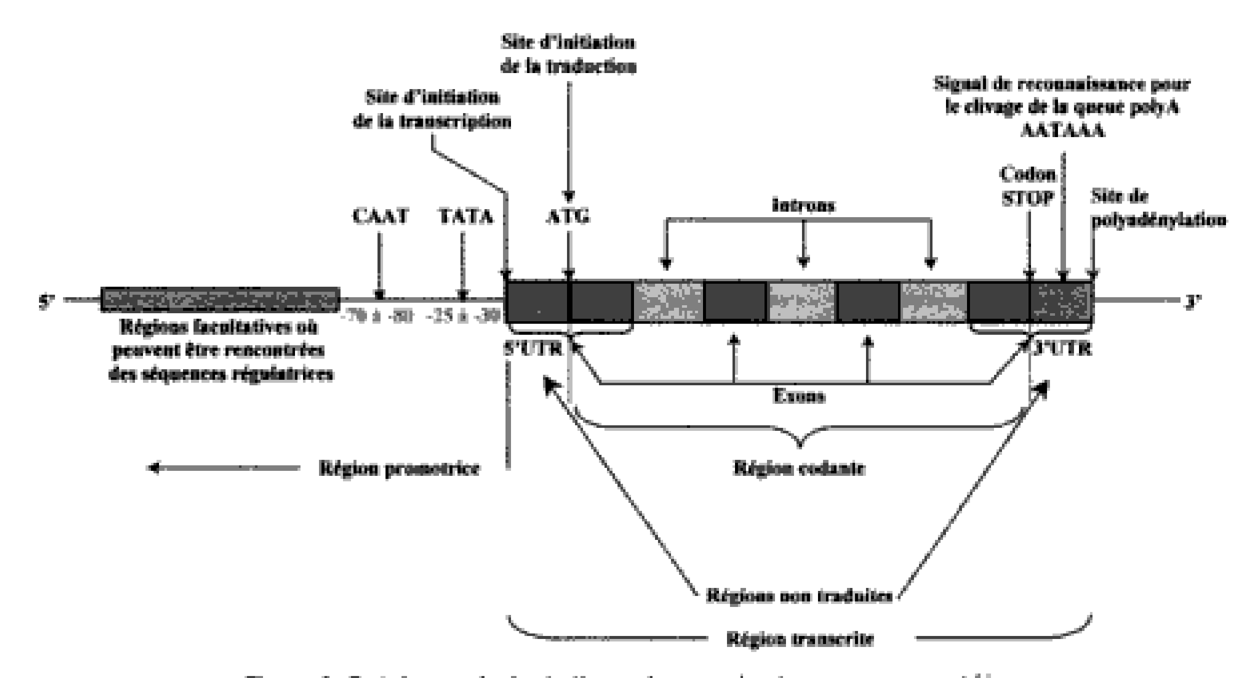


Figure 1. Schéma général d'un gène codant pour une protéine

la transcription suivi d'une partie non codante (5' UTR, *UnTranslated Region*) de longueur variable et ce jusqu'à la séquence ATG, codon méthionine d'initiation de la traduction, localisé au sein de la séquence consensus de Kozak ccnccATGG (avec n = a, c, g ou t). Suivent ensuite une alternance de séquences présentes (exons) ou non (introns) dans l'ARNm cytosolique. Le signal d'arrêt de la traduction est donné par un codon STOP (UAA, UGA, UAG). Enfin, 10 à 20 pb avant la fin du dernier exon est retrouvé le site de reconnaissance pour le clivage de la queue polyA, AATAAA.
Les limites des gènes sont relativement imprécises et les tailles des gènes sont très variables, pouvant dépasser deux millions de pb, souvent sans relation avec la taille de la protéine exprimée.

## II. Différents niveaux de régulation de l'expression des gènes

Il existe plusieurs niveaux de régulation de l'expression des gènes : chromatinien, transcriptionnel, post-transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel (*fig. 2*).

## III. Environnement chromatinien des gènes actifs

### A. Structure de la chromatine

La chromatine est constituée essentiellement de l'ADN du génome complexé à des protéines basiques, les histones. L'unité structurale responsable de la condensation de la chromatine est le nucléosome résultant de l'enroulement de la double hélice de l'ADN autour d'un octamère d'histones (H2A, H2B, H3, H4). Une cinquième histone, l'histone H1, vient sceller les nucléosomes. Au-delà du nucléosome, les niveaux supérieurs de condensation de la chromatine résultent de la propension des nucléosomes à s'empiler régulièrement les uns sur les autres et au rôle structurant, reliant de l'histone H1 dans ces empilements. La fibre chromatinienne de 30 nm constituerait le premier niveau de condensation.
La chromatine du noyau interphasique est constituée de zones d'ombre et de zones claires correspondant respectivement à l'hétérochromatine et à l'euchromatine. L'hétérochromatine périphérique, forme très condensée de chromatine, est dépourvue de gènes actifs. L'euchromatine, forme beaucoup moins condensée, correspond à la fibre chromatinienne de 30 nm et contient les gènes actifs. Sa forme ouverte rend accessibles des protéines impliquées dans l'expression de ces gènes.
Il est possible de mettre en évidence des zones d'accessibilité préférentielle de la chromatine liées à son état de condensation. Ces zones sont appelées « sites sensibles » ou « hypersensibles ». Les sites sensibles correspondent à des gènes

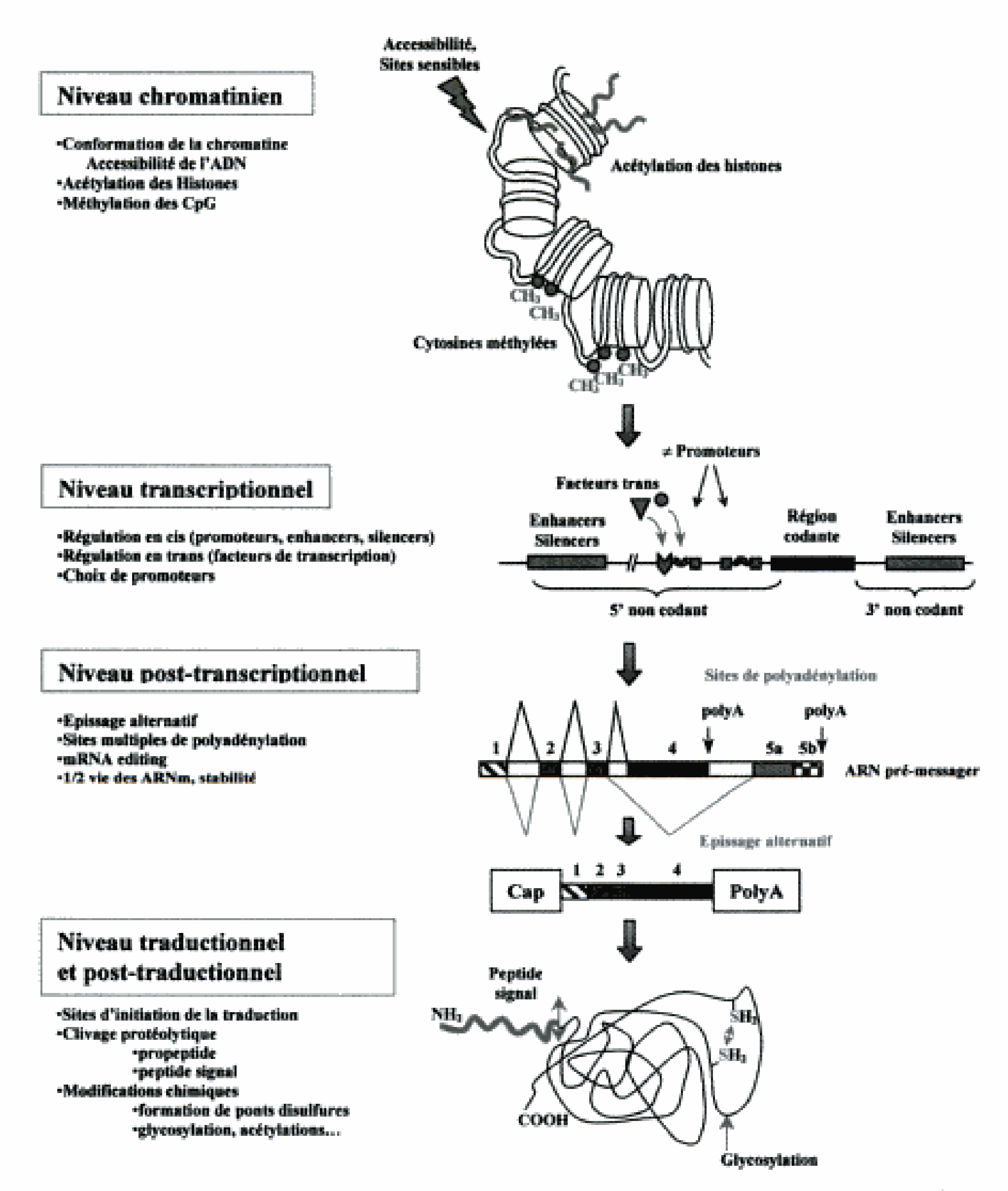
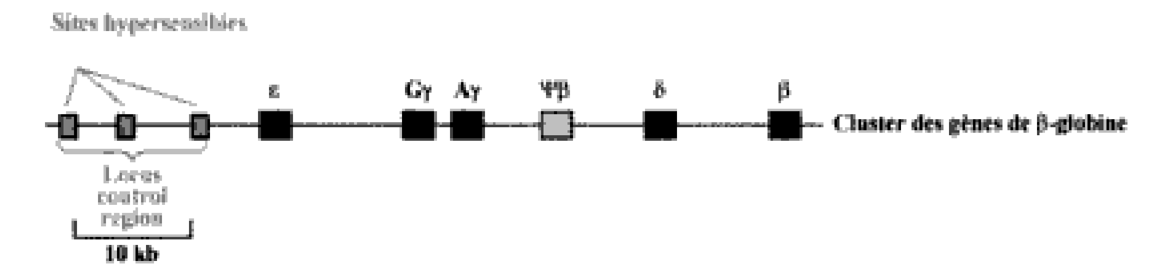



**Figure 2.** Schéma récapitulatif des différents niveaux de régulation de l'expression d'un gène

actifs se trouvant dans une conformation chromatinienne particulière qui les rend accessibles à un certain nombre de protéines comme l'ARN polymérase ou des protéines régulatrices de la transcription. Les sites hypersensibles correspondent aux gènes très activement transcrits.

La formation et le maintien d'un domaine chromatinien ouvert permettant l'accès de protéines régulatrices peuvent être réalisés par des séquences appelées LCR (*locus control region*). Les premiers LCR ont été découverts grâce à l'étude des gènes de la β-globine humaine. Aujourd'hui, on pense qu'ils sont impliqués dans l'expression de nombreux gènes actifs lors du développement.

Le LCR de la β-globine contient au moins trois séquences d'environ 200-300 pb correspondant à des sites de reconnaissance de protéines se liant à l'ADN (*fig. 3*). Ces protéines contrôleraient la structure de la chromatine au sein du domaine fonctionnel. En l'absence de LCR (HS2, HS3 et HS4), l'expression des gènes de β-globine est négligeable.
D'autres sites hypersensibles ont été identifiés au niveau du promoteur de chacun des gènes de globine. Dans le foie fœtal, les promoteurs des deux gènes γ, des gènes β et δ présentent un site hypersensible. Dans la moelle osseuse de l'adulte, les sites hypersensibles localisés dans les promoteurs des deux gènes γ sont absents et la transcription de ces gènes est inexistante.




Trois sites hypersensibles sont localisés 20 kb en amont du cluster β-globine. Ces trois sites marquent l'emplacement du LCR (*locus control region*). Des sites hypersensibles supplémentaires sont retrouvés en amont de chacun des gènes à l'endroit de fixation de l'ARN polymérase. Ces sites hypersensibles ne sont retrouvés qu'à un moment particulier du développement, lorsque le gène adjacent est actif.

**Figure 3.** Représentation du cluster β-globine

## B. Acétylation des histones

Les histones peuvent subir des modifications post-traductionnelles au niveau des domaines N et C terminaux qui peuvent influencer les propriétés dynamiques des nucléosomes. L'acétylation de H3 et de H4 sur les résidus lysine relâche les contraintes appliquées par les domaines N terminaux de H3 et de H4 sur l'ADN nucléosomal. Elle semble également réduire la capacité de l'histone H1 à provoquer la condensation des nucléosomes. La chromatine présente alors une structure ouverte plus adaptée à l'expression de gènes.
En revanche, la désacétylation des histones entraîne la répression de l'expression de gènes. Les histones de l'euchromatine sont acétylées alors que les histones de l'hétérochromatine sont généralement non acétylées. Par ailleurs, une fois la transcription amorcée, l'acétylation des histones pourrait faciliter le déplacement transitoire des nucléosomes au passage de l'ARN polymérase.

## C. Régulation par modification de la structure primaire de l'ADN : méthylation

Les cytosines appartenant aux doublets CpG sont méthylables par des cytosine-méthyl transférases. La méthylation des cytosines situées en particulier dans la région 5' non transcrite des gènes est associée à une diminution de leur activité

transcriptionnelle. Chez l'homme, plus de la moitié des gènes sont localisés près d'îlots CpG. Le profil de méthylation est conservé après division cellulaire, ce qui assure la conservation de l'expression ou de la non-expression d'un gène dans les cellules filles.

Il a été montré que les processus de méthylation de l'ADN et de désacétylation des histones étaient reliés.

La répression de l'expression de gènes présentant des CpG méthylées dans leur région promotrice est médiée par des protéines se liant spécifiquement aux CpG méthylés. Deux de ces protéines, MeCP1 et MeCP2 (*methylated CpG binding proteins 1 and* 2), ont été identifiées. Il a été montré que MeCP2 est essentielle lors du développement embryonnaire et fonctionne comme un répresseur de transcription. La répression de l'expression des gènes par MeCP2 met en jeu un complexe protéique composé d'histones désacétylase. Les histones alors désacétylées permettent la condensation de la chromatine. Les caractéristiques de la chromatine liées à l'activité transcriptionnelle des gènes sont résumées dans le *tableau 1*.

**Tableau 1.** État de condensation de la chromatine, de méthylation des CpG et d'acétylation des histones en fonction de l'activité transcriptionnelle de la région

| | Transcription active | Transcription inactive |
|---|---|---|
| Conformation de la chromatine | Relâchée (euchromatine) | Très condensée (hétérochromatine) |
| Méthylation de l'ADN | ADN déméthylé en particulier niveau régions promotrices | ADN méthylé |
| Acétylation des histones | Histones acétylées | Histones déacétylées |

## D. Reconfiguration de l'ADN

L'expression de certains gènes peut nécessiter une reconfiguration de l'ADN. L'organisation et l'expression des gènes des immunoglobulines (Ig) et du récepteur des cellules T (TCR) dans les cellules B et T sont particulières et sont à l'origine de leur diversité. Les réarrangements de l'ADN aux loci Ig et TCR (recombinaison V-J ou V-D-J) ont lieu au cours de la maturation des cellules B et T.

# IV. Régulation de la transcription

L'initiation de la transcription des gènes se produit par liaison de facteurs de transcription au niveau du promoteur des gènes.

Chaque gène est précédé par une série de séquences régulatrices d'amont séparées par des séquences non critiques. Ces séquences sont capables de modifier le taux de transcription des gènes auxquels elles sont associées : régulation en « cis ».

Les séquences régulatrices d'amont confèrent à un gène des potentialités de régulation (positive ou négative) assurée par des protéines qui s'y fixent et qui sont appelées des facteurs « trans ».

## A. Régulation en « cis »

### 1. Promoteurs

La région promotrice correspond à une combinaison de petits éléments de séquence localisés en amont d'un gène dans les 200 pb qui précèdent le site d'initiation de la transcription.

La région directement en amont du site d'initiation de la transcription permet l'initiation de la transcription et l'expression constitutive du gène en dehors de tout élément de régulation supplémentaire. Des éléments de séquence sont contenus dans les 50 pb qui précèdent le site d'initiation de la transcription :

- **TATA box** (TATA(A/T)A(A/T) en général en position – 25, dans un environnement de séquences riches en GC et reconnue par la *TATA binding subunit* de TFIID) ;
- la séquence **BRE** (TFII B *recognition element*) immédiatement en amont de la TATA box ;
- la séquence **Inr** (*initiator*) localisée au niveau du site d'initiation de la transcription ;
- la séquence **DPE** (*downstream promoter element*) localisée environ 30 pb en aval du site d'initiation de la transcription.

Entre les positions – 50 et – 200 en amont du site d'initiation de la transcription, on retrouve de nombreux sites de reconnaissance de facteurs de transcription ubiquitaires :

- **GC box**, souvent retrouvées dans les 100 pb précédant le site de transcription, site de fixation du facteur ubiquitaire Sp1 ;
- **CAAT box**, localisées en général en position – 75 et reconnues par les facteurs CTF et CBF (*CCAAT-binding transcription factor* = NF-1, *CCAAT-binding factor* = NF-Y).

Ces deux éléments permettent de moduler la transcription basale induite par le promoteur.

### 2. Enhancers

Il s'agit d'éléments de séquence permettant de moduler le taux de transcription. Leur fonctionnalité est indépendante de leur orientation et, jusqu'à un certain niveau, de leur distance par rapport au gène qu'ils régulent. Ces séquences régulatrices de 200-300 pb peuvent contenir des éléments de reconnaissance de facteurs ubiquitaires ou de facteurs de transcription tissus–spécifiques permettant d'envisager une expression de certaines protéines restreinte à certains tissus.

La première séquence stimulatrice (*enhancer*) de cellule eucaryote mise en évidence a été celle des immunoglobulines. Ces séquences ont en commun les propriétés suivantes :

- elles augmentent considérablement le taux de transcription du gène auquel elles sont associées ;
- *leur inversion ne se traduit pas par la perte de leur effet sur la transcription mais par une diminution de leur effet* ;
- elles sont localisées en 5', en 3', voire dans les introns des gènes ;
- elles gardent leur caractère activateur lorsqu'on les déplace.

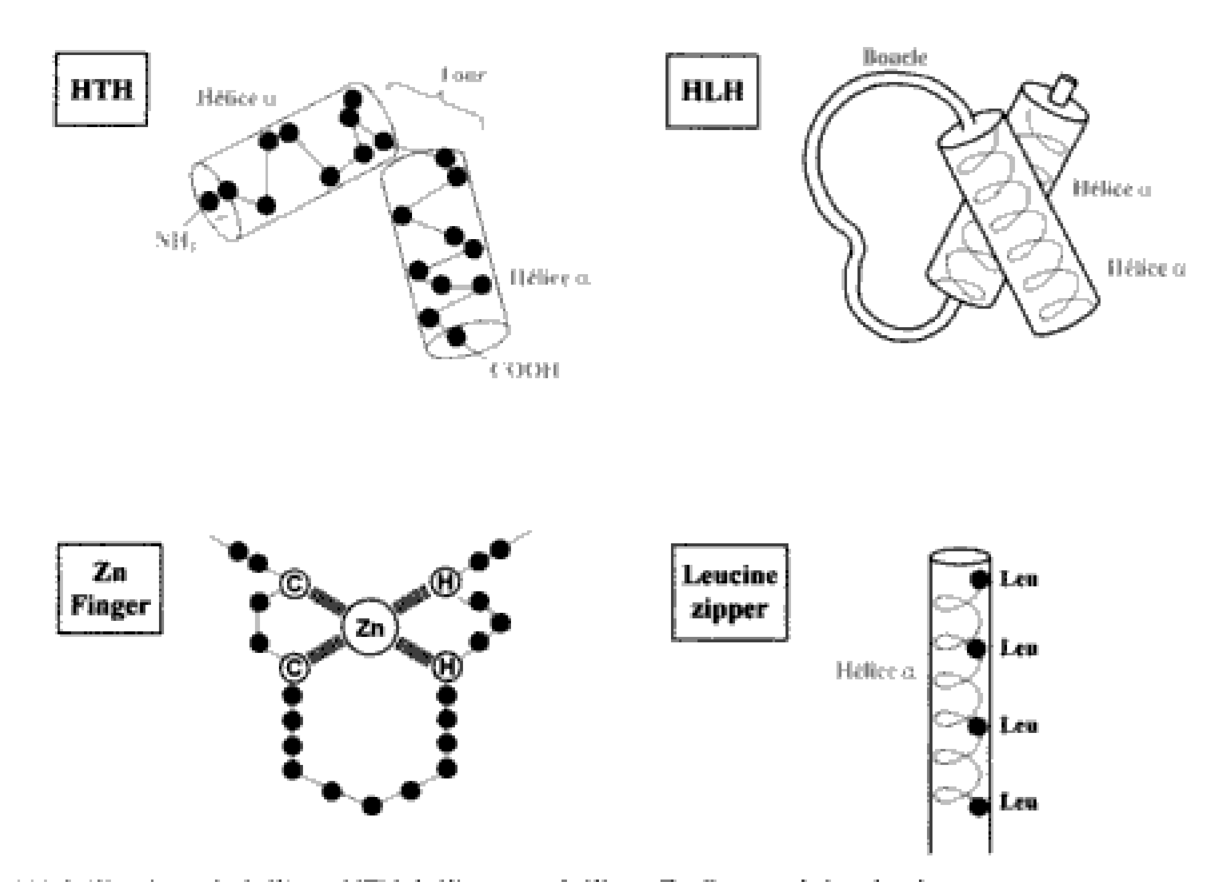
Des séquences de même type mais ayant un effet inverse sur la transcription ont été caractérisées. Elles sont appelées séquences extinctrices (*silencers*).

### 3. Éléments de réponse (RE)

Ces éléments permettent de moduler la transcription en réponse à un stimulus extérieur spécifique. Ils sont habituellement localisés dans les 1 000 pb précédant le site d'initiation de la transcription. De nombreux éléments de réponse ont été décrits associés à l'activation de la transcription de gènes particuliers en réponse à des hormones particulières (hormones stéroïdiennes) ou à un second messager intracellulaire comme l'AMPc.

## B. Régulation en « trans »

Les facteurs de transcription présentent en général deux fonctions distinctes au sein de leur structure avec une région correspondant à un domaine d'activation et une région permettant la liaison à l'ADN.
Le domaine d'activation permet une activation de la transcription une fois le facteur fixé sur sa cible.
Le domaine de liaison à l'ADN est nécessaire à la fixation spécifique du facteur sur les gènes cibles. Un certain nombre de motifs structuraux ont été identifiés : domaines leucine zipper, hélice boucle hélice, hélice tour hélice et doigt de zinc (*fig.* 4). Chacun de ces motifs présente une hélice α (ou quelquefois un feuillet β) pour se lier au grand sillon de l'ADN. La plupart des facteurs de transcription se lient à l'ADN sous forme d'homodimère.




HLH, hélice boucle hélice ; HTH, hélice tour hélice ; Zn finger, doigt de zinc.

**Figure 4.** Motifs structuraux communs aux différents facteurs et protéines de liaison à l'ADN

Les mécanismes de régulation de la transcription en réponse à des signaux cellulaires peuvent être variés mais la finalité est toujours la même : un facteur de transcription

inactif est spécifiquement activé par une voie de signalisation et se lie ensuite à des séquences de régulations spécifiques (éléments de réponse RE) localisées dans le promoteur des gènes cibles activant par conséquent leur transcription.

L'exemple suivant concerne la transduction du signal par l'intermédiaire de l'AMPc. L'AMPc est un second messager important qui agit en réponse à différentes hormones ou autres molécules signal. Il est synthétisé à partir de l'ATP par une enzyme membranaire, l'adénylate cyclase. Les hormones activant l'adénylate cyclase se lient à des récepteurs de la surface cellulaire appartenant à la classe des récepteurs couplés à la protéine G. La liaison de l'hormone à son récepteur induit l'interaction du récepteur à la protéine G comprenant trois sous-unités $\alpha$, $\beta$ et $\gamma$. À la suite de cette interaction, la sous-unité $\alpha$ est activée et entraîne l'activation de l'adénylate cyclase. L'augmentation résultante de l'AMPc intracellulaire peut alors activer la transcription de séquences cibles spécifiques contenant le CRE (*cAMP response element*). Cette fonction de l'AMPc est médiée par une protéine kinase A. L'AMPc se lie à la protéine kinase et l'active par libération de deux sous-unités catalytiques qui entrent alors dans le noyau et phosphorylent un facteur de transcription spécifique, CREB (*CRE binding protein*). Le CREB activé pousse alors la transcription de gènes possédant un CRE (*fig. 5*).

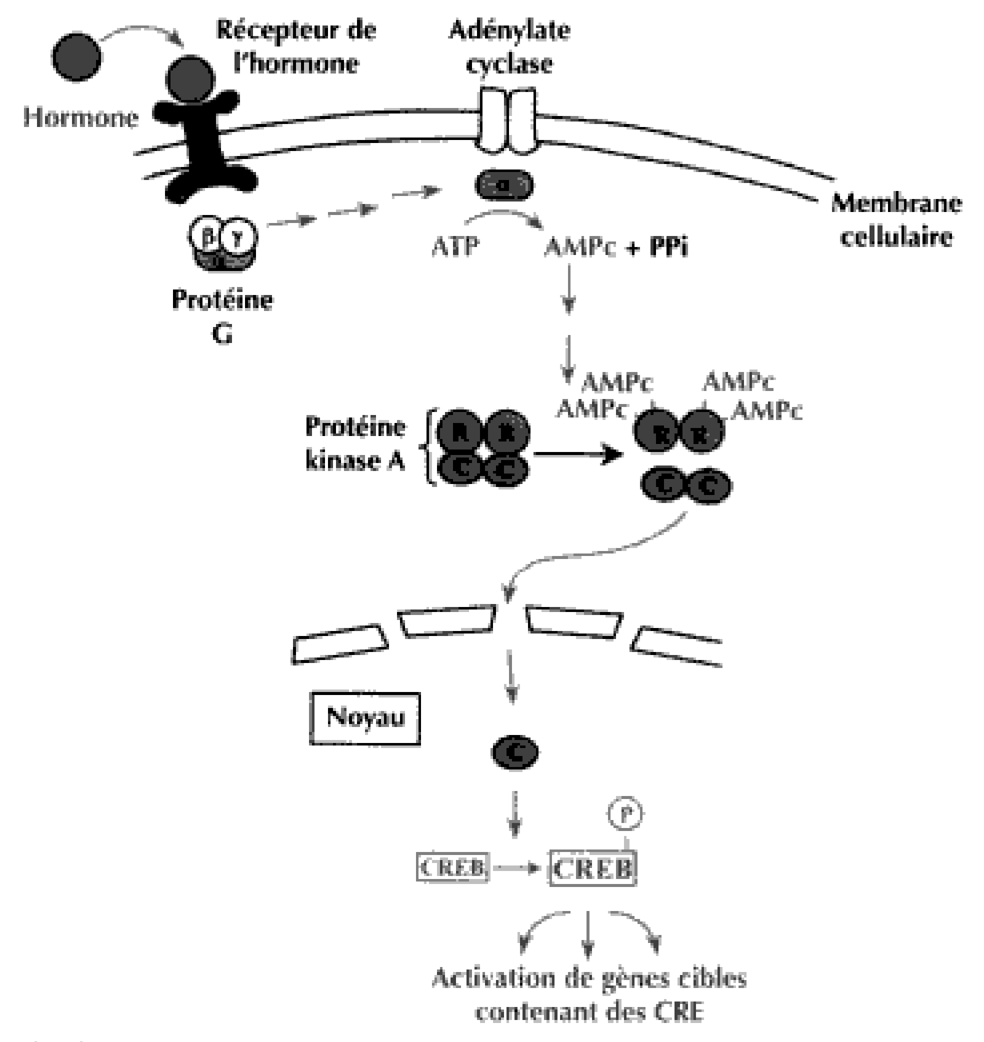



**Figure 5.** Activation de la protéine kinase A et translocation au noyau : signalisation hormonale par la voie de transduction du signal de l'AMPc-protéine kinase A (d'après Strachan T. et Read A.P., 1999)

### C. Choix de promoteur : promoteurs alternatifs

Les exemples les plus connus d'utilisation de différents promoteurs concernent le gène de la dystrophine (plus de 79 exons distribués sur environ 2.4 Mb en Xp21). Il existe au moins huit promoteurs alternatifs utilisables. Quatre d'entre eux sont proches du site traditionnel d'initiation de la transcription et comprennent les promoteurs spécifiques à l'expression dans le cortex cérébral, le muscle, les cellules de Purkinje du cervelet, et les lymphocytes. Ces quatre promoteurs régulent la synthèse d'isoformes de 427 kDa. Quatre autres promoteurs régulent l'expression d'isoformes plus petites de 260 kDa (rétine), 140 kDa (certaines cellules du cerveau et du rein), 116 kDa (cellules de Schwann), 71 kDa (nombreux types cellulaires).
Dans le cas de ce gène, des isoformes supplémentaires résultent d'un épissage alternatif, en particulier dans la région COOH terminale de la protéine.

## V. Régulation post-transcriptionnelle

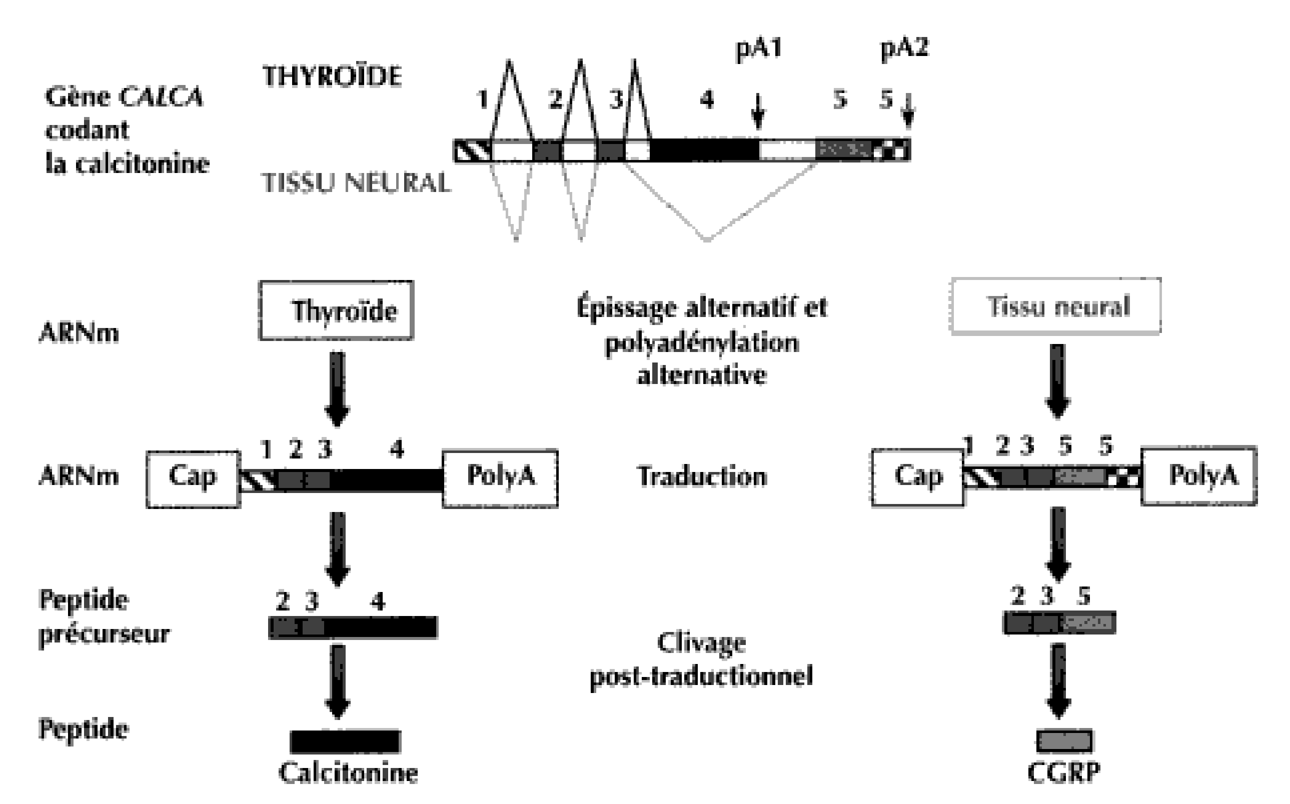
Des mécanismes intervenant au niveau de la maturation de l'ARNm et de son stockage permettent de réguler qualitativement et quantitativement l'expression finale sous forme de protéine.

### A. Épissage alternatif

Un grand nombre de gènes humains subissent un épissage alternatif au cours duquel plusieurs ARNm différents sont produits avec différentes combinaisons d'exons. Il peut alors en résulter une production d'isoformes tissu-spécifiques : la calcitonine, hormone circulante impliquée dans l'homéostasie du $Ca^{2+}$ est produite par la thyroïde. Le CGRP (*calcitonin gene – related peptide*) neuromodulateur est synthétisé dans l'hypothalamus (*fig.* 6). Deux protéines différentes peuvent donc être codées par un même gène.
L'épissage alternatif peut également entraîner l'apparition d'isoformes membranaires et solubles, ou bien la production d'isoformes présentant des localisations intracellulaires différentes, ou bien encore la présence d'isoformes à fonctions différentes.

### B. Sites de polyadénylation multiples

Pour de nombreux gènes, au moins deux sites de polyadénylation ont été rapportés dans la région 3' non codante. Ces polyadénylations différentielles peuvent être associées à la production de transcrits tissu-spécifiques présentant des fonctions parfois différentes (exemple de la calcitonine).




pA1 et pA2 représentent les sites alternatifs de polyadénylation dans la thyroïde et le tissu neural respectivement. À la suite d'un épissage alternatif, la calcitonine est codée par l'exon 4 du gène *CALCA* dans la thyroïde et le CGRP (*calcitonin gene – related peptide*) par la région 5' de l'exon 5 (d'après Strachan T. et Read A.P., 1999).

**Figure 6.** Maturation différentielle tissu-spécifique des produits du gène *CALCA* codant la calcitonine et le CGRP

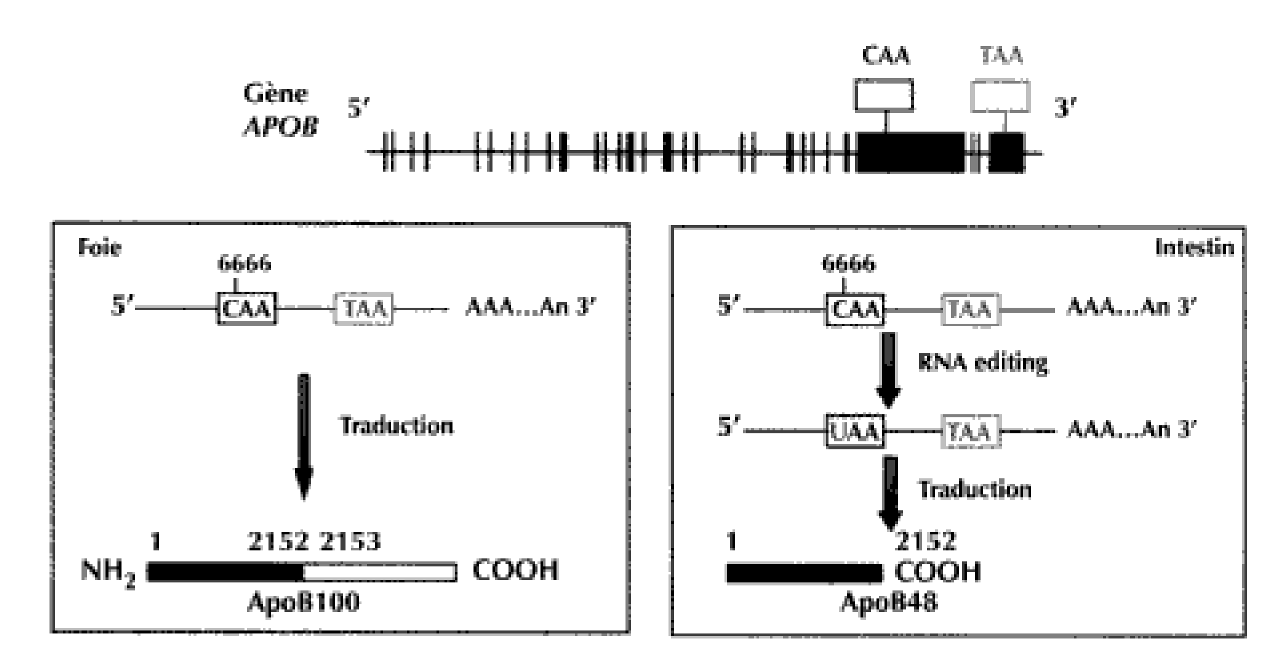
## C. RNA editing

Il s'agit d'une modification post-transcriptionnelle de la séquence de l'ARNm. Ce phénomène semble peu utilisé par la cellule. L'exemple le plus connu concerne la synthèse des apolipoprotéines B. L'Apo B100 est synthétisée dans le foie (512 kDa). L'Apo B48 est synthétisée dans l'intestin (environ 250 kDa) et sa séquence primaire est identique à celle de la partie N-terminale de l'Apo B100. Ces deux protéines sont codées par un même gène (*fig. 7*).

## D. Stabilité des ARNm

La ferritine et le récepteur de la transferrine (TfR), protéines permettant respectivement le stockage et l'entrée du fer dans la cellule, représentent un excellent modèle de régulation post-transcriptionnelle concertée. Lorsque des hépatocytes sont incubés en présence de fer, la traduction du messager de la ferritine est augmentée et ceci extrêmement rapidement, tandis que le messager du TfR n'est plus traduit (en fait, il est détruit).

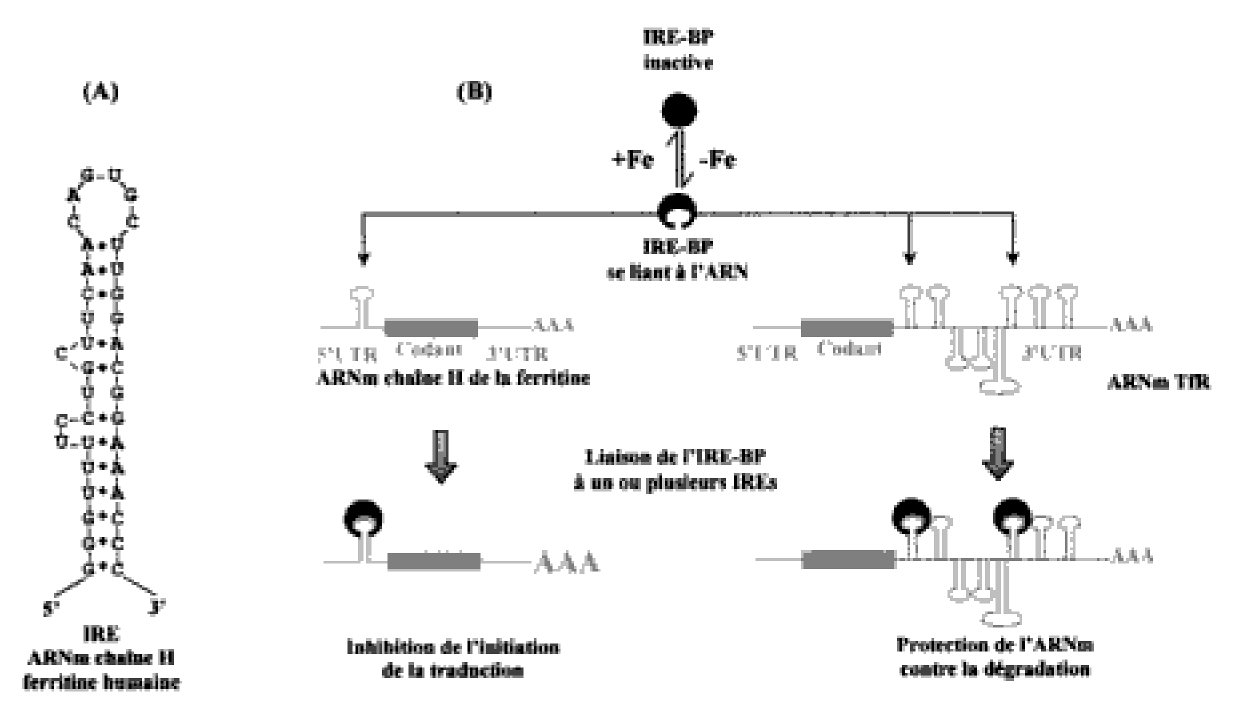
L'analyse de la structure des messagers de ces deux protéines montre qu'ils possèdent tous les deux une séquence en épingle à cheveux IRE (*iron responsive element*) susceptible de fixer une protéine régulatrice IRP (*iron responsive protein*). Le messager de la ferritine possède des IRE dans sa partie 5', alors que le messager du TfR possède des IRE dans sa région 3' (*fig. 8*). En l'absence de fer, l'IRP est active et se fixe sur les IRE. Elle empêche ainsi la traduction de l'ARNm de la ferritine et stabi-




Dans le foie, on retrouve en position 6666-6668 du gène la séquence CAA (codon 2153 Gln). Le produit de ce gène est l'Apo B100. Dans l'intestin, une cytosine désaminase, l'ApoBec 1 convertit la cytosine 6666 en uridine générant un codon 2153 STOP et entraînant la synthèse d'un produit plus court, l'Apo B48 (d'après Strachan T. et Read A.P., 1999).

**Figure 7.** « RNA editing » et expression du gène de l'APOB dans l'intestin

lise le messager du TfR alors traduit. En présence de fer, l'IRP est inactive, les IRE sont libres. La traduction de la ferritine est active. L'ARNm du TfR n'est pas traduit car instable, il est détruit. Ce système permet à la cellule de réagir de manière optimale et très rapide en fonction de la concentration intracellulaire en fer.




A : structure de l'IRE de la région 5'UTR de l'ARNm de la chaîne H de la ferritine humaine.
B : fixation de l'IRE BP (*IRE binding protein*) en l'absence de fer. La traduction de la ferritine est alors impossible. L'ARNm du TfR est stabilisé et traduit (d'après Strachan T. et Read A.P., 1999).

**Figure 8.** Régulation post-transcriptionnelle des ARNm de la ferritine et du récepteur de la transferrine (TfR), rôle des IRE (*iron responsive element*)

# VI. Régulation post-traductionnelle

## A. Acquisition de la structure tertiaire

Le polypeptide est inactif jusqu'à ce qu'il se replie en une structure tertiaire adéquate.

## B. Clivage protéolytique

Certaines protéines sont formées après une coupure réalisée par des protéases. Ces coupures se produisent à une ou aux deux extrémités du polypeptide entraînant une réduction de la taille de la protéine. Les protéases peuvent également couper le polypeptide en de nombreux segments, chacun d'entre eux étant actif.
Exemple de l'insuline : l'insuline est synthétisée à partir de la prépro-insuline, peptide de 105 AA. La voie de synthèse de l'insuline implique l'excision des 24 premiers AA pour former la pro-insuline suivie de deux coupures supplémentaires qui excisent un segment central (le peptide C) donnant naissance aux deux parties actives de la protéine, la chaîne A et la chaîne B qui se lient entre elles par deux ponts disulfures.
Le premier segment de 24 AA excisé est un peptide signal extrêmement hydrophobe qui permet l'adressage de la protéine précurseur à la membrane cellulaire avant le transport transmembranaire et la sécrétion extracellulaire.

## C. Modifications chimiques

Les acides aminés du polypeptide peuvent être modifiés par addition de groupements chimiques : O-glycosylation sur des sérines ou des thréonines, N-glycosylation sur des asparagines, méthylation, acétylation, phosphorylation, hydroxylation, addition de chaînes lipidiques…

# Conclusion

Toutes les étapes impliquées dans l'expression d'un gène conduisant à la production d'une protéine peuvent être soumises à une régulation particulièrement fine permettant ainsi un contrôle de l'expression des gènes au niveau des différents tissus mais également à un niveau chronologique (différents stades embryonnaires, cycles cellulaires).
Si la grande majorité des événements régulateurs se produisent lors de l'initiation de la transcription, l'environnement chromatinien ainsi que les événements post-transcriptionnels, traductionnels et post-traductionnels jouent également un rôle fondamental dans la régulation qualitative et quantitative de l'expression finale du gène sous forme de protéine.

## L'essentiel de la question

De nombreux mécanismes sont impliqués dans la régulation de l'expression des gènes au niveau de différents tissus ou dans le temps (embryogenèse, cycle cellulaire...). Les différents niveaux de régulation correspondent aux différentes étapes nécessaires à l'expression du gène, de son accessibilité au sein de la chromatine à son produit d'expression : la protéine.

Au niveau chromatinien, l'état de condensation de la chromatine, l'acétylation des histones des nucléosomes, la méthylation de cytosines appartenant aux doublets CpG en particulier dans la région 5' non transcrite des gènes, influencent l'activité transcriptionnelle des gènes.

Au niveau transcriptionnel, le taux basal de transcription induit par le promoteur minimal d'un gène (régulation en *cis*) peut être finement modulé par la liaison de facteurs protéiques (régulation en *trans*) susceptibles de reconnaître des séquences spécifiques de l'ADN au niveau d'autres régions *cis*régulatrices dans des séquences flanquant le gène ou également dans ses introns (*enhancers, silencers*). La fixation de ces protéines régulatrices confère à la transcription sa spécificité tissulaire et chronologique. Un gène peut également coder différents variants protéiques dans différents tissus en utilisant des promoteurs alternatifs, tissus spécifiques.

La régulation de l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel regroupe des mécanismes intervenant dans la maturation de l'ARN comme l'épissage, l'adressage, le stockage, la dégradation. L'épissage peut conduire à une diversité importante de produits issus d'un même gène (épissage alternatif). Dans différents tissus, l'épissage alternatif d'un même transcrit peut conduire à des protéines de structure voisine ou franchement différentes (calcitonine et CGRP). L'utilisation de site de polyadénylation alternatif peut également conduire à la production de protéines différentes. L'ARNm peut également subir des modifications au niveau de sa séquence (*RNA editing* et APOB).

L'ARNm mature est adressé vers le lieu où il sera pris en charge par les ribosomes pour être traduit en protéine. L'acheminement de l'ARNm vers un territoire subcellulaire spécifique, son stockage, sa stabilité (ARNm de ferritine, récepteur de la transferrine) déterminent ainsi le comportement et l'abondance de la protéine résultante.

Au niveau traductionnel et post-traductionnel, la maturation des protéines, leur adressage, les modifications chimiques post-traductionnelles tels que les clivages de propeptides, les glycosylations, méthylations constituent différents niveaux de régulation... Les protéines codées par les gènes peuvent être acheminées à différents endroits de la cellule ou exportées au niveau extracellulaire et, dans certains cas, différentes isoformes issues de l'expression du même gène pourront avoir des adressages différents.

***Pour en savoir plus***

- Alberts B., Bray D., Johnson A. *et al. Essential cell biology : an introduction to the molecular biology of the cell.* Garland Publishing Inc., 1998.
- Brown T.A. *Genomes.* Garland Science, 3ᵉ éd., 2006.
- Kaplan J.-C., Delpech M. *Biologie moléculaire et médecine.* Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 1993.
- Strachan T., Read A.P. *Human Molecular Genetics* 3. Garland Science Publishing, 3ᵉ éd., 2003.

# Biochimie fondamentale

# Métabolisme du glycogène

J.-F. BENOIST, D. PORQUET
Laboratoire de biochimie, Faculté de pharmacie, Paris-XI

*L'accumulation de glycogène dans les tissus, notamment le muscle et le foie, est un processus physiologique en réponse à l'augmentation de la glycémie en période postprandiale. Les voies métaboliques de la synthèse du glycogène sont tissu-dépendantes et impliquent l'action successive de différentes protéines et enzymes. La glycogénolyse est une voie qui dégrade le glycogène en glucose-1-phosphate (Glc 1-P) et en un peu de glucose. La glycogénolyse hépatique est un processus qui participe à la régulation de la glycémie (voir chapitre suivant) alors que dans tous les autres tissus, le glucose-6-phosphate (Glc 6-P) produit est localement utilisé à des fins énergétiques. Le métabolisme du glycogène est finement régulé de façon tissu-spécifique et fait intervenir les principaux modes de régulation enzymatique (allostérie, modification covalente par phosphorylation-déphosphorylation, régulation par l'expression génique et par la disponibilité en substrat). Du fait du rôle particulier du glycogène hépatique dans la régulation de la glycémie, il existe des isoformes spécifiques du foie pour pratiquement toutes les enzymes du métabolisme du glycogène. Nous aborderons ici uniquement les aspects de la régulation de ce métabolisme dans le foie et le muscle.*

# I. Glycogénogenèse

## A. Substrats de la glycogénogenèse

Le substrat direct de la *glycogène synthase* (GS) est l'*UDP glucose* (UDP-Glc). Sur le plan énergétique, la production d'UDP-Glc à partir du glucose consomme deux équivalents ATP. En période postprandiale, le glucose alimentaire est le pourvoyeur de l'UDP-Glc pour tous les tissus avec une particularité pour l'hépatocyte qui accepte aussi le galactose. Après leur entrée dans la cellule, le plus souvent par diffusion facilitée, le glucose et le galactose sont phosphorylés en Glc 6-P et Gal 1-P, ce qui évite une éventuelle rétrodiffusion.
Dans le cas du glucose, la phosphorylation est assurée par une *hexokinase*. Elle est d'un type particulier dans le cas de l'hépatocyte et de la cellule β du pancréas : la *glucokinase*.

$$\text{Glc} + \text{ATP} \rightarrow \text{Glc 6-P} + \text{ADP}$$

Le Glc 6-P est ensuite isomérisé en Glc 1-P par l'action réversible de la *phosphoglucomutase*. Bien que réversible, l'équilibre est fortement en faveur du Glc 6-P (95 %). La glycogénogenèse ne peut donc s'effectuer qu'en présence de fortes concentrations intracellulaires en Glc 6-P.

$$\text{Glc 6-P} \leftrightarrow \text{Glc 1-P}$$

L'UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase ou *UDP-glucose* pyrophosphorylase catalyse réversiblement le transfert du Glc 1-P sur une molécule d'UTP avec libération de pyrophosphate provenant des deux résidus phosphoryles externes de l'UTP. L'hydrolyse du pyrophosphate par une pyrophosphatase déplace l'équilibre vers la formation d'UDP-Glc.

$$\text{UTP} + \text{Glc 1-P} \leftrightarrow \text{UDP-Glc} + \text{PPi}$$

$$\text{PPi} \rightarrow 2\text{Pi}$$

Le galactose suit dans l'hépatocyte une voie métabolique différente par les trois premières étapes : phosphorylation en Gal 1-P par la galactokinase de l'hépatocyte.

$$\text{Gal} + \text{ATP} \rightarrow \text{Gal 1-P}$$

Acquisition par le Gal 1-P d'un groupe uridyle venant de UDP-Glc par l'*UDP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase*

$$\text{Gal 1-P} + \text{UDP-Glc} \leftrightarrow \text{UDP-Gal} + \text{Glc 1-P}$$

Épimérisation de l'UDP-Gal en UDP-Glc par l'*UDP-glucose 4-épimerase*

$$\text{UDP-Gal} \leftrightarrow \text{UDP-Glc}$$

Les différents tissus sont équipés en transporteurs du glucose et en kinases variant dans leurs structures, affinité et régulation. (voir chapitre suivant). Cela conditionne fortement le débit glucosé d'un tissu à l'autre et explique en grande partie les particularités du métabolisme du glycogène selon les tissus.

## B. Formation de la molécule de proglycogène

À l'origine de toute molécule de glycogène se trouve une protéine amorce de 37 kDa : la *glycogénine*. La glycogénine possède une activité glycosyltransférase qui lui permet de s'autoglycosyler à partir d'UDP glucose. Un premier résidu glucosyl est transféré sur l'hydroxyle phénolique d'une tyrosine de la protéine, suivi de la fixation en $\alpha$ 1,4 de cinq à sept autres résidus glucosyls pour former la molécule de glycogénine glycosylée.
Une molécule de *proglycogène* (MM ≈ 400 kDa) est ensuite formée par les actions successives d'une isoforme de la *glycogène synthase* de très haute affinité pour l'UDP-Glc (Km # µM), et de *l'enzyme branchante* (voir plus loin). Ces deux enzymes sont activées par des interactions protéine–protéine avec la glycogénine. À partir des molécules de proglycogène seront synthétisées puis dégradées – en fonction du statut nutritionnel et hormonal – les molécules de *macroglycogène* (MM ≈ $10^7$ kDa). À ce stade, il est important de constater que :

- le nombre de granules de glycogène est en relation directe avec le nombre de molécules de glycogènine ;
- que la glycogène synthase n'est active que lorsqu'elle est en contact avec la glycogénine.

## C. Allongement des chaînes de glycogène

La glycogénogenèse comme on l'entend classiquement est d'abord le fait de l'allongement des chaînes $\alpha$ 1,4-glucosidiques assurée par la *glycogène synthase (GS)*. Le substrat de la GS est l'UDP-Glc. C'est une glucosyltransférase qui prélève le résidu glucosyl de l'UDP-Glc pour le fixer par une liaison $\alpha$ 1,4 sur le $C^4$ du résidu glucosyl accepteur d'une des extrémités non réductrices d'une molécule de glycogène. L'apport en Glc 6-P et la vitesse de la réaction catalysée par la GS sont les étapes limitantes de la glycogénogenèse.

Macroglycogen synthase +
Branching enzyme
UDP
UDP glucose
Pi
Glc 1-P
Phosphorylase +
Debranching enzyme system
Macroglycogen (Mr $10^7$ Da)
Proglycogen (Mr $_{400}$ kDa)
UDP
Proglycogen
synthase +
Branching enzyme
UDP glucose
$P_1$
Phosphorylase +
Debranching
enzyme system
Glc 1-P
I
In
Tyr 194
Autocatalysis
Tyr
Apo-Glycogenin
Mr $_{37}$ kDa
UDP glucose
UDP
Fully glucosylated
glycogenin, priming
the synthesis of proglycogen

**Figure 1.** Synthèse du proglycogène et du macroglycogène (d'après J. Lomako *et al.*, 2004)




À noter que chaque chaîne A et B possède à peu près la même longueur et qu'il y a deux branchements par chaîne B. Seules cinq couches ont été représentées ici, alors qu'il y en a une dsouzaine sur la molécule complète (d'après Melendez-Hévia *et al.*, 2000).

**Figure 2.** Représentation schématique du macroglycogène

## D. Ramification du glycogène

Le glycogène présente une structure arborescente très branchée (une ramification pour # 8 résidus) Quand l'allongement d'une chaîne est suffisant, une α *1,4-α 1,6-transglycosylase (enzyme branchante)* catalyse le transfert d'un oligosaccharide terminal comportant six ou sept résidus glucosyles prélevés sur une extrémité non réductrice (comportant au minimum onze résidus) et le fixe en α 1,6 sur un résidu glucosyl intrachaîne. Il se crée ainsi une nouvelle ramification, point de départ pour une nouvelle chaîne α 1,4-glucosidique (*fig.* 2). Il n'existe pas de régulation à ce niveau, c'est l'apport en substrat, c'est-à-dire l'activité de la GS, qui conditionne l'activité de l'enzyme branchante.

## E. Bilan énergétique

La mise en réserve d'une molécule de glucose ou de galactose sous forme de glycogène consomme deux équivalents ATP (1ATP +1 UTP).

# II. Glycogénolyse

## A. Produits de glycogénolyse

Le produit de la glycogène phosphorylase est le Glc 1-P. Celui-ci est rapidement isomérisé en Glc 6-P par la phosphohexomutase (réaction réversible mais équilibre largement en faveur du Glc 6-P comme vu précédemment). L'action de l'enzyme débranchante produit pour sa part du glucose libre en quantité proportionnellement très limitée, qui sera rapidement phosphorylé en Glc 6-P. À l'exception du foie et de très rares autres tissus qui expriment une glucose-6-phosphatase et qui peuvent ainsi libérer du glucose dans la circulation générale, les autres tissus utilisent le Glc 6-P par la voie de la glycolyse à une fin énergétique.

## B. Raccourcissement des chaînes de glycogène

La *glycogène phosphorylase* catalyse le transfert d'un résidu glucosyle prélevé sur une extrémité non réductrice du glycogène pour le fixer sur un groupement OH de l'acide phosphorique formant une molécule de *glucose-1-phosphate*. À noter que cette réaction permet de mobiliser le glucose d'un glycogène sous une forme directement activée en récupérant l'énergie qui se trouve dans la liaison osidyle, économisant ainsi l'énergie nécessaire pour la phosphorylation du glucose. C'est l'étape limitante du catabolisme qui est elle aussi finement régulée, comme nous le verrons plus loin. La réaction générale de dégradation du glycogène est la suivante :

$$\underset{\text{glycogène}}{(\text{glucose})n} + \text{Pi} \rightarrow \underset{\text{glycogène}}{(\text{glucose})n\text{-}1} + \text{glucose-1-phosphate}$$

La glycogène phosphorylase s'arrête à quatre unités glucose en amont d'une ramification α 1-6 (« dextrine limite »).

## C. Suppression des ramifications

Les ramifications sont élaguées par deux activités enzymatiques localisées sur une même protéine : l'*enzyme débranchante*. Lorsque les chaînes terminales non réductrices deviennent trop courtes pour permettre l'action de la glycogène phosphorylase, une *α 1,4-α 1,4-transglycosylase* (4-alpha-glucanotransferase) prélève un oligosaccharide de trois résidus sur un branchement en ne laissant que le résidu α 1,6-glucosyl. Cet oligosaccharide est transféré en α 1,4 sur l'extrémité non réductrice d'une autre chaîne.

La seconde activité enzymatique est une activité *α-glucosidase* (amylo-alpha-1,6-glucosidase), qui hydrolyse l'α-1,6-glucosyl résiduel et libère du glucose (*fig.* 2). La glycogène phosphorylase peut ainsi poursuivre la glycogénolyse. L'enzyme débranchante ne semble pas soumise à régulation mais elle ne fonctionne que dans la mesure où la glycogène phosphorylase lui fournit un substrat.

L'action combinée de la glycogène phosphorylase et de l'enzyme débranchante aboutit à la diminution de la masse moléculaire des molécules de glycogène. Si en situation physiologique la concentration en glycogène reste stable, on observe en revanche des variations importantes de la masse moléculaire par renouvellement rapide autour des extrémités non réductrices.

## D. Hydrolyse lysosomique du glycogène

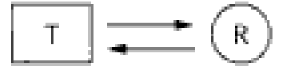
Comme tous les constituants d'une cellule, le glycogène est soumis à un renouvellement continu, réalisé par les hydrolases acides des lysosomes. C'est ainsi que la maltase acide hydrolyse le glycogène qui est dirigé vers l'intérieur des lysosomes. Cette enzyme improprement appelée maltase acide est en fait une α-glucosidase qui libère du glucose.

# III. Régulation du métabolisme du glycogène

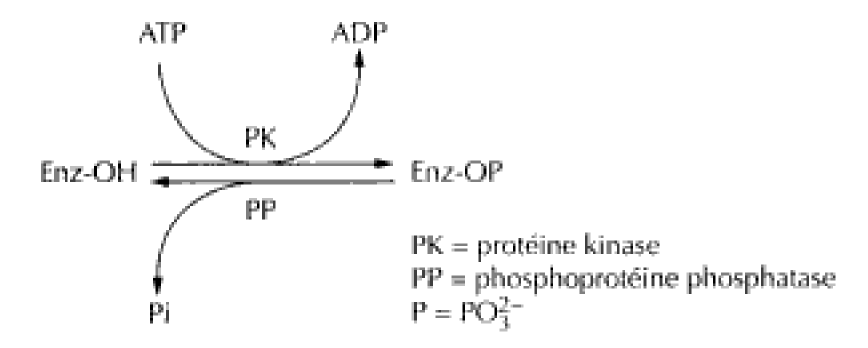
## A. Considérations générales

La régulation du métabolisme du glycogène porte sur deux enzymes d'effet opposé. La glycogène synthétase intervient dans la glycogénogenèse et la glycogène phosphorylase, dans la glycogénolyse. Comme pour beaucoup d'enzymes clés du métabolisme, cette régulation implique :

- à très court terme (échelle de l'ordre de la fraction de seconde), un mécanisme par *allostérie* avec modification par l'*effecteur* enzymatique de l'équilibre entre une conformation tendue *T* (encore appelée « forme b ») par définition peu active, et une conformation relâchée R, par définition plus active (encore appelée « forme a ») ;



• à court terme (échelle de l'ordre de la minute), un mécanisme par *phosphorylation-déphosphorylation* qui va également modifier l'équilibre entre les deux conformations T et R. La proportion relative de chaque forme dépend de l'activité de protéines kinases et de phosphoprotéine-phosphatases qui sont elles-mêmes contrôlées par la concentration en divers deuxièmes messagers (AMPc, GMPc, IP3, DAG, Ca2+...). Une stimulation hormonale provoque ainsi par le déplacement de l'équilibre R ⇄ T une modification d'activité enzymatique.




Exemple pour la glycogène synthase : la phosphorylation déplace l'équilibre R ⇄ T vers la forme T peu active.

T–OP ⇄ R–OP

La déphosphorylation déplace l'équilibre R ⇄ T vers la forme R plus active.

T–OH ⇄ R–OH

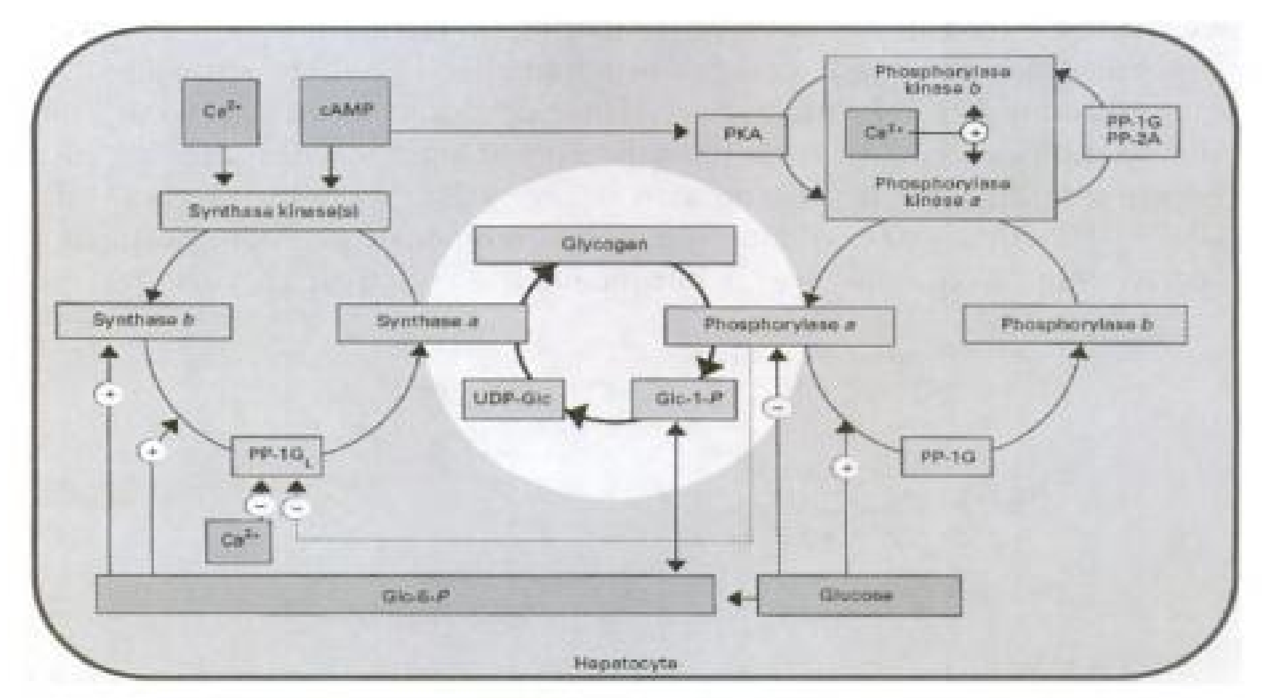
Le G6-P en se fixant sur la forme R minoritaire de la GS phosphorylée (majoritairement sous forme T peu active), entraîne un déplacement de l'équilibre R ⇄ T vers la forme R.

Exemple pour la pour la glycogène phosphorylase :

• la phosphorylation déplace l'équilibre R ⇄ T vers la forme R plus active ;
• la déphosphorylation déplace l'équilibre R ⇄ T vers la forme T moins active ;
• le glucose en se fixant sur la forme T minoritaire de l'enzyme phosphorylée (majoritairement sous forme R, plus active), entraîne un déplacement de l'équilibre R ⇄ T vers la forme T.

La phosphorylation provoque donc un effet inverse sur les deux enzymes catalysant des réactions opposées. Quand le message porté par les seconds messagers active les protéines kinases, les enzymes sont phosporylées, donc la glycogénolyse stimulée et la glycogénogenèse inhibée. C'est l'inverse quand les deuxièmes messagers provoquent la déphosphorylation des enzymes.

Ce dispositif, qui se retrouve d'ailleurs dans beaucoup d'autres régulations cellulaires, empêche la formation d'un cycle futile dans lequel la glycogénolyse et la glycogénogenèse fonctionneraient en même temps sans résultat mais en consommant inutilement de l'énergie. La glycogène synthase et la glycogène phosphorylase ne peuvent pas être activées en même temps.




Abréviations : PKA, protein kinase A ; Glc 1-*P*, glucose-1-phosphate ; Glc 6-*P*, glucose-6-phosphate ; UDP-Glc, UDP-glucose.

**Figure 3.** Régulation du métabolisme du glycogène dans le foie

## B. Phosphorylation de la glycogène phosphorylase (GP)

On sait depuis longtemps qu'une élévation de la concentration intracellulaire en second messager (AMPc et $Ca^{++}$) entraîne une phosphorylation de la glycogène phosphorylase qui se trouve ainsi transformée en forme « a » plus active. Cette activation fait naturellement intervenir des protéines kinases AMPc et/ou $Ca^{++}$ dépendantes.

Les différentes isoformes de la GP comportent toutes un seul site de phosphorylation au voisinage de l'extrémité N terminale. Il est maintenant bien établi que seule une protéine kinase particulière, la glycogène phosphorylase kinase (GPK), est capable *in vivo* de phosphoryler ce site. La GPK est constituée de quatre sous-unités : une sous-unité catalytique (γ) et trois sous-unités régulatrices. Les deux premières (α et β) sont elles-mêmes régulées par phosphorylation-déphosphorylation et la troisième (δ), par fixation de calcium. La GPK est ainsi activée soit par fixation du $Ca^{++}$ sur sa sous-unité, soit par phosphorylation de ses sous-unités α et β par la protéine kinase A. Elle constitue donc un relais obligatoire pour les seconds messagers (AMPc/$IP_3$) et participe ainsi à un effet d'amplification de leur signal (chaque molécule d'une enzyme activée active à son tour un grand nombre de molécules d'une autre enzyme).

En pratique, l'activation de la de la GPK par le calcium concerne essentiellement le muscle lors de la contraction musculaire. L'activation de la GPK par phosphorylation (par la PKA) est, dans le foie, sous le contrôle principal du glucagon et accessoirement des catécholamines et, dans le muscle, sous le contrôle des catécholamines. La GPK activée active à son tour la GP et induit la glycogénolyse.

## C. Phosphorylation de la glycogène synthase (GS)

Contrairement à ce que nous venons de voir pour la glycogène phosphorylase, les différentes isoformes de la GS comportent de très nombreux sites de phosphorylation et sont phosphorylées par plusieurs protéines kinases. Par exemple, la GS musculaire possède une dizaine de sites de phosphorylation et peut être phosphorylée par au moins huit protéines kinases différentes. Tous les sites de phosphorylation ne se retrouvent pas dans toutes les isoformes, d'où pour chaque tissu une sensibilité différente et adaptée de la GS à diverses stimulations de la glycogénogenèse. En pratique, la phosphorylation de la glycogène synthase qui conduit à son inactivation est majoritairement réalisée par la protéine kinase A, dont l'activité est induite par les catécholamines dans le muscle, et le glucagon, accessoirement les catécholamines, dans le foie.

## D. Déphosphorylation de la GS, de la GP et de la GPK

L'équilibre fondamental, enzyme phosphorylée-enzyme déphosphorylée doit pouvoir être déplacé dans les deux sens pour assurer la réversibilité des régulations. Les phosphorylations par les protéines kinases sont compensées par les déphosphorylations réalisées par les phosphoprotéines-phosphatases. Dans le métabolisme du glycogène, ces déphosphorylations sont principalement catalysées par une seule phosphoprotéine-phosphatase, la phosphoprotéine-phosphatase 1 (PP 1). Cette PP 1 participe à la régulation de nombreux métabolismes. Elle s'associe à différentes « protéines de ciblage » (*targeting sub-units*) pour se spécialiser dans la régulation d'un métabolisme. Associée à une protéine de ciblage, malencontreusement appelée protéine G (G pour « glycogène »), elle s'incorpore aux particules de glycogène et, de fait, se spécialise dans la régulation de son métabolisme. De plus, cette association à la protéine de ciblage G augmente l'activité spécifique de la PP 1. Afin d'éviter toute confusion, il faut bien noter qu'il ne s'agit absolument pas d'une « protéine G hétérotrimérique », protéine de transduction associée aux nucléotides guanyliques et douée d'une activité GTPasique.

La PP 1 est elle-même régulée par un peptide inhibiteur (Inh 1). Quand ce peptide est phosphorylé par la protéine kinase A, il se fixe sur le centre actif de la PP 1 pour l'inhiber. Nous avons donc un mécanisme autoprotégé : la protéine kinase A activée par l'AMPc entraîne directement ou indirectement la phosphorylation de la glycogène synthétase et de la glycogène phosphorylase pour déclencher la glycogénolyse et en même temps phosphoryle l'inhibiteur 1 pour empêcher la déphosphorylation de ces enzymes. Pour interrompre cette stimulation glycogénolytique, il faut l'intervention d'une autre phosphoprotéine phosphatase, la PP 2B (CaM) qui, en déphosphorylant l'inhibiteur 1 lève l'inhibition de la PP 1 et permet la déphosphorylation de la glycogène synthétase et de la glycogène phosphorylase. C'est le second messager $Ca^{++}$ qui interrompt le message de l'AMPc.

Pendant cette même stimulation, la phosphorylase kinase a également été activée par phosphorylation de ses sous-unités $\alpha$ et $\beta$ par la protéine kinase A, participant

ainsi à la régulation du métabolisme du glycogène. La PP 2A (CaM) déphosphoryle la sous-unité α en même temps que l'inhibiteur 1 phosphorylé. La PP 1 peut ainsi déphosphoryler la sous-unité β.
Enfin, la protéine phosphatase 1 elle-même existe sous deux formes interconvertibles, une forme phosphorylée et active, et une forme non phosphorylée et inactive. Cette phosphorylation est catalysée par une protéine kinase stimulée par l'insuline.

## E. Régulations complémentaires par allostérie

- *Le glucose-6-phosphate* est un activateur allostérique de la GS phosphorylée ($T_{OP}$ peu active • $R_{OP}$ plus active). Une accumulation locale de Glc-6P entraîne donc une glycogénogenèse en dehors de toutes stimulations externes. Ce mécanisme se retrouve dans le foie comme dans le muscle.
- *La charge énergétique :* l'élévation de la concentration intracellulaire en *AMP* est un témoin très sensible d'un manque d'énergie. L'AMP est un activateur allostérique de la GP non phosphorylée ($T_{OH}$ peu active → $R_{OH}$ plus active). En dehors de toute stimulation hormonale par modification covalente, la glycogénolyse peut donc être déclenchée très rapidement localement par un manque d'énergie et ainsi fournir du substrat pour la glycolyse qui, dans cet état physiologique, est elle-même stimulée au niveau de la PFK1 par le même message délivré par le même effecteur allostérique : l'AMP. L'ATP produit rétablit la charge énergétique de la cellule. Ce mécanisme est très efficace dans le muscle. Dans l'hépatocyte, la charge énergétique se maintient généralement à un niveau élevé et cette régulation n'intervient qu'exceptionnellement.
- *Le glucose* se comporte comme un inhibiteur allostérique de la GP phosphorylée ($R_{OP}$ plus active → $T_{OP}$ peu active). Quand il se trouve à concentration suffisante dans le cytosol, il se fixe sur son site en provoquant un changement de conformation R → T de la GP phosphorylée qui devient ainsi un meilleur substrat pour la PP1. La PP1 se fixe fortement sur la GP phosphorylée (conformation R en majorité) mais elle ne devient vraiment active que lorsque la GP phosphorylée passe dans la conformation T. Ainsi la fixation du glucose inactive la $GP_{OP}$ par deux actions successives :
  - le déplacement instantané vers la conformation T peu active ;
  - la déphosphorylation de T conséquente à ce déplacement. Ce phénomène se manifeste essentiellement dans l'hépatocyte dans lequel l'influx et l'efflux de glucose se produisent librement en fonction du gradient de concentration, grâce à un transporteur membranaire indépendant de l'insuline (GLUT2). La glycogénolyse hépatique en réponse à une stimulation hyperglycémiante (e.g., glucagon), peut être inhibée par une concentration intracellulaire élevée en glucose qui, dans cette situation physiologique, provient de l'hydrolyse du glucose-6-phosphate produit par la gluconéogenèse. La sécrétion du glucose par l'hépatocyte étant assurée par cette gluconéogenèse, il devient inutile de poursuivre la glycogénolyse, la glycogène phosphorylase étant inhibée. Après un certain temps de jeûne, la gluconéogenèse prend ainsi le relais de la glycogénolyse.

## F. Régulation du métabolisme du glycogène dans différents tissus

La régulation du métabolisme du glycogène est surtout spectaculaire dans le foie et le muscle strié.

### a) Foie

Dans le foie, c'est l'hépatocyte (cellule épithéliale représentant environ les deux tiers de la masse cellulaire hépatique) qui assure la mise en réserve du glucose sous forme du glycogène et sa libération par glycogénolyse dans le cadre plus général de la régulation de la glycémie. Le glycogène hépatique représente une réserve pour l'ensemble de l'organisme. Elle se constitue en période d'apports alimentaires. Pendant le jeûne, le glucose libéré par l'hépatocyte est utilisé par les tissus périphériques. Dans l'hépatocyte, il est généralement accepté de tous que ce sont les apports en Glc 6-P et la GS qui constituent les étapes limitantes de la synthèse du glycogène. La glycogénolyse est sous le contrôle de la glycogène phosphorylase.

- La présence du transporteur *GLUT2* fait de l'hépatocyte un senseur du glucose, il permet de maintenir un équilibre entre les concentrations extracellulaire et intrahépatique. C'est l'activité de la *glucokinase*, isoforme hépatique d'hexokinase de faible affinité pour le glucose (voir chapitre suivant) qui contrôle l'apport en glucose-6P. Ce n'est que lorsque la glycémie dépasse une concentration de l'ordre de 5mM que le foie fait significativement des réserves de glycogène. Dès que les concentrations intracellulaires en glucose-6-P dépassent un certain seuil, il y a activation allostérique de la glycogène synthase b (forme peu active) afin de permettre la mise en réserve du glucose sous forme de glycogène.
- *L'insuline*, hormone hypoglycémiante, porte le message d'une abondance des apports de nutriments, ce qui dans l'hépatocyte se traduit par une mise en réserve du glucose sous forme de glycogène. Le récepteur de l'insuline fait partie de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase. La liaison de l'insuline à son récepteur entraîne la levée de l'inhibition de l'activité tyrosine kinase du domaine CT intracytoplasmique, ce qui se traduit par l'autophosphorylation sur des résidus tyrosine de ce domaine. Pendant l'activation transitoire, le récepteur de l'insuline provoque également la phosphorylation de résidus tyrosines de plusieurs protéines. De plus, l'autophosphorylation du récepteur entraîne un changement de conformation qui, d'une part, maintient l'activité de la tyrosine kinase et, d'autre part, permet son interaction avec diverses protéines régulatrices. L'endocytose des récepteurs occupés par l'insuline participe probablement aux mécanismes de transduction. Seule une partie des récepteurs endocytés est recyclée à la membrane, le reste est dégradé. L'ensemble de ces phénomènes consécutifs à la liaison de l'insuline à son récepteur entraîne une déphosphorylation de la glycogène synthétase et de la glycogène phosphorylase. La cascade de réactions entre l'activation de la tyrosine kinase et la déphosphorylation de ces enzymes n'est pas encore bien connue. Dans certains types cellulaires, une diminution de la concentration en AMPc par activation d'une AMPc phosphodiestérase expliquerait ce phénomène, mais ce mécanisme n'est certainement pas généralisable à tous les tissus.
- *Le glucagon*, hormone hyperglycémiante, porte le message signalant un manque de glucose dans les tissus périphériques. Il déclenche rapidement dans l'hépato-

cyte la glycogénolyse et la sécrétion de glucose en même temps qu'il stimule par ailleurs la gluconéogenèse et permet indirectement le passage des acides gras dans les mitochondries pour y être oxydé, avec formation des coenzymes réduites et d'ATP nécessaire pour cette gluconéogenèse. Le mécanisme de transduction du message du glucagon fait intervenir un récepteur de la « super famille » des récepteurs à sept segments transmembraines couplé aux protéines G hétérotrimériques et un effecteur, l'adénylate cyclase. Le mécanisme général de transduction par une protéine Gs s'applique à celui du glucagon avec activation transitoire de l'adénylate cyclase et production du second messager, l'AMPc. L'élévation de la concentration en AMPc active la protéine kinase A qui, à son tour, phosphoryle de nombreuses protéines – en particulier la glycogène synthétase et la phosphorylase kinase qui, dans un second temps, active la glycogène phosphorylase. L'arrêt du signal est déclenché d'une part par une insensibilisation du récepteur et d'autre part par l'activation secondaire d'une AMPc phosphodiestérase qui hydrolyse l'AMPc en AMP. La concentration en AMPc diminue et la stimulation s'interrompt. Les phosphoprotéines-phosphatases déphosphorylent les protéines phosphorylées avec retour à l'équilibre initial.

- *Rapport insuline-glucagon.* C'est donc en définitive le rapport insulinémie-glucagonémie qui contrôle cette régulation. Ceci est d'autant plus sensible que le foie, étant irrigué par le sang de la veine porte, est le premier organe à recevoir l'insuline et le glucagon libérés dans la circulation par le pancréas. La concentration en ces hormones est cinq à dix fois plus élevée dans la veine porte que dans la veine sus-hépatique. Le foie est donc de très loin l'organe qui consomme le plus d'insuline et de glucagon. Cette imprégnation par les hormones pancréatiques est surtout importante pour les hépatocytes alignés dans les travées cellulaires de la région périportale. Elle diminue progressivement sur le trajet sanguin vers la veine sus-hépatique. Du fait de la consommation des hormones, leur concentration sanguine diminue progressivement. Le métabolisme des hépatocytes périportaux est nettement « hépatocytaire ». Dans l'extrémité périveineuse des acinis, ce métabolisme tend progressivement vers celui d'un tissu périphérique. Cela explique l'hétérogénéité fonctionnelle des hépatocytes selon leur localisation dans les acinis.
- *L'adrénaline*, par l'intermédiaire des récepteurs β3 de l'hépatocyte, peut dans une certaine mesure agir dans le même sens que le glucagon. Son récepteur appartient à la même super famille des récepteurs à sept segments transmembranaires et son activation provoque également une activation de la PKA (secondaire à l'activation de l'activité adénylate cyclase) qui dans un second temps phosphoryle la glycogène synthase et la phosphorylase kinase. Au final, il y a activation de la glycogénolyse et dans le même temps répression de la glycogène synthase.
- D'autres hormones agissent également potentiellement sur le métabolisme hépatique du glycogène, notamment la vasopressine et l'angiotensine II. Cependant, il est difficile d'apprécier l'importance fonctionnelle de l'intervention de ces hormones dans différentes situations physiologiques et pathologiques.

### b) Muscle strié

Dans le muscle strié, la situation est très différente de celle du foie. Le glycogène constitue une réserve locale (individuelle pour chaque cellule) permettant de four-

nir très rapidement le glucose-6-phosphate à la glycolyse pour donner l'énergie nécessaire au début d'une contraction musculaire. Ultérieurement, le glucose extracellulaire complétera cet apport en attendant l'indispensable prise de relais par le catabolisme des acides gras, voire des corps cétoniques, pour un effort plus prolongé. Il faut donc une régulation du métabolisme du glycogène corrélée avec le déclenchement de la contraction musculaire, d'où le rôle prépondérant du calcium. L'élévation de la concentration en $Ca^{++}$ cytosolique, secondaire à la dépolarisation de membrane et à l'origine de cette contraction musculaire, active dans le même temps la phosphorylase kinase par fixation du $Ca^{++}$ sur sa sous-unité δ (calmoduline). Comme nous l'avons vu, cette phosphorylase kinase phosphoryle à la fois la glycogène synthase (inactivation) et la glycogène phosphorylase (activation), d'où la glycogénolyse.

Par ailleurs, sous l'effet de l'adrénaline, les récepteurs β adrénergiques provoquent l'élévation de la concentration en AMPc. La protéine kinase A ainsi activée phosphoryle les sous-unités α et β de la phosphorylase kinase, ce qui renforce son activation et surtout la rend plus sensible à de plus faibles concentrations en calcium. De plus, la protéine kinase A phosphoryle l'inhibiteur 1 de la phosphoprotéine-phosphatase A et ainsi contribue à maintenir les enzymes sous forme phosphorylée et à prolonger la glycogénolyse. Dans une certaine mesure, une décharge d'adrénaline contribue à un apport de glucose indispensable pour un effort musculaire bref. Après un certain délai, c'est le calcium qui, en activant le PP2A (CaM), déclenche la réversibilité de cette régulation.

Enfin, dans le muscle, l'activation allostérique de la phosphorylase b par l'AMP maintient la glycogénolyse en période de forte consommation d'énergie, indépendamment de toute régulation externe.

***Pour en savoir plus***


- Lomako J., Lomako W.M., Whelan W.J. Biochim Biophys Acta. 2004 ; 1673 : 45-55.
- Melendez R., Melendez-Hevia E., Canela E.I. Biophys J. 1999 ; 77 : 1327-32.

# Régulation de la glycémie

J.-F. BENOIST, D. PORQUET
Laboratoire de biochimie, Faculté de pharmacie, Paris-XI

*Le glucose est un substrat énergétique essentiel, voire indispensable pour certains tissus. Or peu d'entre eux peuvent en produire et leurs capacités de stockage sont limitées. En revanche, tous les tissus possèdent des transporteurs pour importer le glucose à partir du sang, c'est pourquoi la concentration en glucose dans le sang (glycémie) est un paramètre biologique étroitement régulé et relativement constant. Toute dysrégulation de la glycémie a des conséquences pathologiques parfois sévères. À jeun, les valeurs usuelles sont comprises entre 3,9 et 5,3 mmol/L. Les variations de la glycémie reflètent la différence entre les prélèvements de glucose par les tissus périphériques et les apports provenant de l'absorption intestinale et de la sécrétion hépatique, et dans certaines conditions rénale. De très nombreuses régulations métaboliques, hormonales et nerveuses participent au maintien de la glycémie. Le glucose sanguin représente une masse de glucose comprise entre 5 et 5,5 g pour un adulte. Le glucose du secteur extracellulaire peut être estimé à environ 15 g. Le glycogène hépatique représente une réserve de 80 à 90 g de glucose, constitué pendant la période postprandiale. Cette réserve sert quasi exclusivement au maintien de la glycémie entre les repas.*

# I. Transfert du glucose dans les cellules

Toutes les cellules peuvent capturer le glucose extracellulaire à l'aide de transporteurs dont il faut distinguer deux types. Dans le cas des cellules polarisées comme celles de l'épithélium digestif ou celles du tube contourné rénal qui assurent respectivement l'absorption digestive et la réabsorption urinaire du glucose au travers de la membrane du pôle apical, le transport du glucose s'effectue contre un gradient de concentration. Pour lutter contre ce gradient défavorable, une pompe ATPase Na/K dépendante génère un contre-gradient de sodium et le glucose est échangé contre une molécule de sodium par un transport antiport. Les transporteurs responsables du transport actif antiport sodium-glucose appartiennent à la famille SGLT (*sodium-dependent glucose transporter*). Trois gènes ont été clonés, dont les deux principaux représentants, SGLT1 et SGLT2, sont respectivement exprimés au niveau de l'intestin et du tubule rénal. Au pôle basolatéral des cellules épithéliales, comme à la membrane plasmique des cellules non polarisées, le glucose traverse grâce à des transporteurs membranaires fonctionnant selon un mécanisme de diffusion facilitée. Le déplacement du glucose s'effectue selon son gradient de concentration, sans consommation d'énergie. Il est saturable et réversible. Ces transporteurs constituent une famille d'isoformes présentant de fortes homologies de séquence : les GLUT (*glucose transporter*). Onze gènes ont été clonés : chaque GLUT se caractérise par sa constante de dissociation pour le glucose. Parmi les plus importants, citons :

- GLUT1 et GLUT3, qui sont exprimés dans presque toutes les cellules. Ils ont une affinité moyenne pour le glucose et assurent l'entrée basale du glucose dans les cellules ;
- GLUT2, qui est exprimé dans le foie et le pancréas. Il présente une faible affinité pour le glucose et intervient essentiellement en phase postprandiale, lorsque la glycémie portale est élevée, pour l'entrée du glucose dans les cellules de ces deux

tissus. Le même GLUT2 assure l'efflux de glucose hors de l'hépatocyte dans les périodes de jeûne ;

- GLUT4, qui est exprimé dans les muscles et le tissu adipeux, présente une très forte affinité pour le glucose. Il se différencie des autres GLUT car, à l'état basal, il se localise dans des vésicules sous-membranaires. C'est la liaison de l'insuline avec son récepteur qui entraîne instantanément une translocation de GLUT4 à la membrane plasmique, augmentant ainsi brutalement le nombre de transporteurs fonctionnels. Ce phénomène est réversible avec retour à l'état basal en l'absence de stimulation par l'insuline. Le nombre de transporteurs GLUT4 à la membrane plasmique est donc directement proportionnel à l'insulinémie, c'est ce qui caractérise les tissus *insulinodépendants*.

Un nombre limité de tissus (muscles striés, adipocytes...) sont insulinodépendants pour l'influx de glucose car ils expriment GLUT1 et GLUT4. GLUT1 assure un influx basal de glucose suffisant en période de repos mais très insuffisant pour répondre à la moindre sollicitation. GLUT4, dont la translocation vers la membrane plasmique est sous le contrôle de l'insulinémie, autorise un influx important de glucose dans les phases postprandiales immédiates.

Les tissus qui expriment GLUT1, GLUT3 ou GLUT5 sont dits « insulino-indépendants » pour l'influx de glucose (cellules nerveuses, rénales, épithéliales ainsi que les globules rouges). La vitesse de pénétration du glucose est indépendante de l'insulinémie. Le nombre de transporteurs GLUT insérés dans la membrane plasmique est constant et assure un influx de glucose suffisant quand la glycémie se trouve dans les limites physiologiques. Les tissus insulino-indépendants pour l'influx de glucose sont par ailleurs très sensibles à l'hypoglycémie. Un influx de glucose insuffisant est à l'origine de souffrance cellulaire qui dans le cas des cellules nerveuses peut être responsable de lésions irréversibles du système nerveux central.

Dans tous les cas, l'influx de glucose dans la cellule – et le prélèvement de glucose dans le secteur extracellulaire – dépend du gradient de glucose, du nombre de transporteurs fonctionnels et du $k_d$ des transporteurs. Le gradient de glucose correspond à la différence entre la glycémie et la concentration du glucose intracellulaire. Cette concentration intracellulaire en glucose est toujours très faible. En effet, dans un tissu périphérique, l'hexokinase assure la phosphorylation rapide du glucose selon une réaction irréversible :

$$\text{Glucose} + \text{ATP} \rightarrow \text{Glucose-6-phosphate} + \text{ADP}$$

Comme les hexokinases présentent un Km extrêmement faible pour le glucose ($10^{-4}$ à $10^{-5}$ mol/L), elles agissent rapidement dès les faibles concentrations en glucose entrant dans la cellule. Le glucose-6-phosphate ne pouvant pas traverser la membrane plasmique, l'action de l'hexokinase empêche ainsi toute ressortie du glucose et maintient le gradient de glucose à son maximum.

*L'hépatocyte* (cellule épithéliale parenchymateuse représentant environ les deux tiers du foie) et la *cellule* β *du pancréas* expriment GLUT2 et se classent dans les tissus insulino-indépendants pour l'influx de glucose. Par ailleurs, ces cellules expriment une isoforme très particulière de l'hexokinase, la glucokinase, d'affinité beaucoup plus faible pour le glucose que l'hexokinase. Par conséquent, la mise en réserve du glucose dans l'hépatocyte sous forme de glycogène ne se fera que pour

des glycémies élevées, tout comme la production d'insuline qui ne devient très significative qu'en cas d'hyperglycémie. De même, la sécrétion de glucose par l'hépatocyte, *via* GLUT2, pour le maintien de la glycémie ne se fera qu'en présence d'une concentration intra-hépatocytaire en glucose élevée.

# II. Capture et sécrétion de glucose par les tissus

*Les besoins en glucose des tissus périphériques sont assurés par un prélèvement dans la circulation sanguine.*

À l'état basal, au repos et à jeun, la circulation sanguine doit fournir au minimum 1 mmol/min de glucose (200 mg/min). Le cerveau et le système nerveux en consomment environ 60 %, les éléments figurés du sang environ 20 % et les muscles au repos environ 20 %. La quantité de glucose disponible dans le secteur extracellulaire, environ 15 g, n'est pas suffisante pour répondre à cette demande au-delà de quelques dizaines de minutes. Le glucose sécrété par les hépatocytes doit compenser assez rapidement celui qui est prélevé par les tissus périphériques. Par ailleurs, au début d'un effort musculaire brutal, la consommation de glucose peut atteindre 25 mmol/min (soit 5 g par minute). Le glycogène musculaire étant rapidement épuisé, une production hépatique par glycogénolyse est indispensable pour le maintien de la glycémie en attendant que le catabolisme des acides gras relaye la glycolyse pour fournir l'énergie aux muscles.

## A. Apport de glucose en période postprandiale

Un repas équilibré devrait représenter environ 120 g de glucides assimilables qui, après digestion, fournissent du glucose, du galactose et du fructose. Le glucose, qui possède dans l'intestin grêle un transporteur actif par antiport glucose-$Na^+$, est absorbé plus rapidement que le fructose. À l'état physiologique, il se produit une légère hyperglycémie postprandiale. Cette hyperglycémie est à l'origine d'une sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas. Les glucides absorbés se retrouvent d'abord sous forme de glycogène hépatique. Le reste est soit consommé par les tissus périphériques pendant la période postprandiale, soit mis en réserve sous forme de glycogène musculaire ou de triglycérides dans les adipocytes. L'alimentation apporte des quantités significatives de galactose et de fructose. À l'état physiologique, c'est l'hépatocyte qui assure le métabolisme de ces glucides. Les autres tissus n'interviennent pratiquement pas.

Le galactose est transformé en galactose-1-phosphate par la galactokinase et se trouve orienté vers la formation d'UDP-galactose et donc d'UDP-glucose utilisé pour la synthèse de glycogène et d'autres glycoconjugués.

Le fructose est transformé en fructose-1-phosphate par la fructokinase. La fructose-1-phosphate aldolase le transforme en dihydroxyacétone phosphate et en glycéraldéhyde qui participent à la gluconéogenèse quand la fructose 1,6 bisphosphatase est activée, ce qui n'est pas le cas en période postprandiale (insulinémie-glucagonémie élevée).

### B. Rôle privilégié de l'hépatocyte dans la régulation de la glycémie : sécrétion et fixation du glucose

L'hépatocyte est pratiquement le seul type cellulaire avec les cellules du cortex rénal à posséder une glucose-6-phosphatase qui hydrolyse le glucose-6-phosphate en acide phosphorique et en glucose qui est ensuite libérable dans la circulation. La glucose-6-phosphatase se localise dans les canalicules du réticulum endoplasmique. Le glucose-6-phosphate traverse la membrane du réticulum grâce à un transporteur spécifique de kd assez élevé. Quand le glucose-6-phosphate est produit massivement, soit par glycogénolyse, soit par gluconéogenèse, sa concentration cytosolique devient suffisante pour lui permettre de passer dans le réticulum afin d'être hydrolysé en glucose qui est sécrété. Par ailleurs, l'hépatocyte exprime une glucokinase qui se caractérise par son affinité élevée pour le glucose et est très peu active pour de faibles concentrations intracellulaires en glucose.
En période d'hyperglycémie, cette concentration intracellulaire augmente et la glucokinase devient plus active. En phosphorylant le glucose, elle contribue à sa fixation en période d'hyperglycémie. Le glucose-6-phosphate formé ne peut pas sortir de la cellule et il est orienté vers la glycogénogenèse.
Il faut noter que si l'hépatocyte possédait une hexokinase analogue à celle des tissus périphériques, il fixerait activement le glucose, même pour des glycémies modérées. Enfin, nous avons vu que l'hépatocyte exprime GLUT2. L'influx et la sécrétion de glucose ne se font que pour des concentrations élevées en glucose. Cet ensemble de particularités – GLUT2, glucokinase, glucose-6-phosphatase – qui ne se retrouvent pas dans les autres tissus, permet à l'hépatocyte de jouer un rôle prépondérant dans la régulation de la glycémie. Certaines cellules du cortex rénal expriment également une glucose-6-phosphatase. Ce n'est qu'après un jeûne très prolongé (> 3 jours) que le rein contribue ainsi d'une manière très significative (> 30 %) au maintien de la glycémie en développant une intense gluconéogenèse. L'entérocyte, qui présente un certain nombre d'analogies métaboliques avec l'hépatocyte, possède également une glucose-6-phosphatase mais ne semble pas participer significativement au maintien de la glycémie.

## III. Régulation des voies métaboliques contribuant au maintien de la glycémie

### A. Régulation des voies métaboliques contribuant à la sécrétion de glucose dans la circulation sanguine (voir aussi la question sur le métabolisme du glycogène)

#### 1. Glycogènolyse hépatique

La glycogène phosphorylase catalyse la *phosphorolyse* d'un résidu glucosyle α 1,4 de l'extrémité non réductrice du glycogène avec libération de glucose-1-phos-

phate. Cette enzyme fonctionne comme une transglycosylase avec l'acide phosphorique comme accepteur. L'énergie de la liaison osidyle se trouve conservée dans la liaison glucosyl-1-phosphate permettant l'économie de l'ATP qui serait nécessaire pour activer le glucose en glucose-6-phosphate.

La glycogène phosphorylase est d'abord régulée par phosphorylation-déphosphorylation. La forme active, la phosphorylase a, est phosphorylée et la forme inactive, phosphorylase b, est déphosphorylée.

*In vivo*, la phosphorylation est réalisée uniquement par une kinase spécifique, la phosphorylase kinase. La phosphorylase kinase est elle-même activée soit par liaison avec le calcium sur sa sous-unité δ, soit par phosphorylation de ses sous-unités α et β par la protéine kinase A (AMPc-dépendante). Les stimulations hormonales qui provoquent une augmentation de la concentration en second messager AMPc ou $Ca^{++}$ déclenchent donc la glycogénolyse. Dans l'hépatocyte, le glucagon joue un rôle prédominant dans le déclenchement de la glycogénolyse. Cette stimulation passe par l'activation de la protéine kinase A qui, à son tour, active la phosphorylase kinase. Cette cascade d'activation permet un effet amplificateur autorisant une réponse rapide face à un besoin en glucose. Les catécholamines, quoiqu'à un degré moindre, sont également activatrices de la glycogénolyse hépatique. L'effet des catécholamines peut être consécutif soit à leur liaison sur des récepteurs alpha-1 adrénergiques, soit sur des récepteurs bêta-adrénergiques.

Il faut noter que la régulation de la glycogène synthétase est contrôlée par le même mécanisme mais de manière opposée (forme phosphorylée inactive, forme déphosphorylée active) à celle de la glycogène phosphorylase. Glycogénolyse et glycogénogenèse ne peuvent dès lors avoir lieu en même temps et l'insuline, qui par un mécanisme complexe déclenche la déphosphorylation de la glycogène synthétase et de la glycogène phosphorylase, s'oppose à l'action du glucagon et oriente le flux métabolique vers la synthèse de glycogène.

À côté de la régulation de la glycogène phosphorylase par phosphorylation-déphosphorylation, cette enzyme peut également être modulée par allostérie : ainsi, le glucose se comporte comme un modulateur allostérique négatif de la glycogène phosphorylase a alors que le glucose-6-phosphate est un activateur allostérique de la glycogène synthase b (voir la question sur le glycogène). Dans l'hépatocyte, une augmentation de la concentration en glucose pendant une stimulation hyperglycémiante (insulinémie-glucagonémie faible) signifie que la gluconéogenèse est capable de satisfaire la demande en termes de sécrétion de glucose et qu'il est préférable d'interrompre la glycogénolyse. Grâce à cette régulation allostérique, la gluconéogenèse prend progressivement le relais de la glycogénolyse après quelques heures de jeûne.

## 2. Gluconéogenèse

Cette voie métabolique, essentiellement hépatocytaire et secondairement rénale, réalise la synthèse du glucose à partir de précurseurs glucoformateurs divers.

Le flux métabolique de cette voie dépend avant tout de la concentration intracellulaire et ainsi des apports sanguins au foie en substrats glucoformateurs (principalement l'alanine et le lactate, et accessoirement le glycérol et les autres acides aminés glucoformateurs), ainsi que de l'activité spécifique des enzymes de cette

voie : pyruvate carboxylase (PC), phosphoénol pyruvate carboxykinase (PEPCK), fructose 1,6 bisphosphatase et glucose-6-phosphatase. L'activité néoglucogénique est également fonction de la concentration intracellulaire de ces enzymes. Les hormones hyperglycémiantes (glucagon, glucocorticoïdes...) induisent la synthèse de ces enzymes. Par opposition, l'insuline est l'hormone clé qui inhibe la gluconéogenèse en réprimant l'expression de la PEPCK et de la glucose-6-phosphatase. Par ailleurs, comme ces enzymes ont une demi-vie relativement brève, après quelques heures d'imprégnation hormonale, il se produit des variations très significatives de la concentration en enzymes et du flux métabolique. Il s'établit ainsi un cycle nycthéméral en fonction des périodes de jeûne interprandiales. D'autres enzymes contribuant à la transformation de substrats glucoformateurs comme les aminotransférases subissent ce même type de régulation.

### a) Considérations métaboliques sur la gluconéogenèse

Dans la gluconéogenèse à partir du pyruvate, l'énorme différence d'énergie libre pour le passage du pyruvate au phosphoénolpyruvate impose une voie métabolique en deux étapes, la consommation de deux équivalents d'ATP et le transfert de métabolites entre le cytosol et la mitochondrie pour contourner l'étape correspondante de la glycolyse qui produit un ATP. La pyruvate carboxylase (PC), enzyme intramitochondriale à biotine, catalyse la fixation d'anhydride carbonique pour former l'oxaloacétate et consomme un ATP. Dans la seconde étape, la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), enzyme cytosolique, transforme l'oxaloacétate en PEP et en anhydride carbonique avec consommation de GTP. Or l'oxaloacétate, intermédiaire commun à ces deux réactions, ne peut pas traverser la membrane interne de la mitochondrie. Il doit être métabolisé en une autre molécule possédant un transporteur membranaire spécifique. Ainsi l'oxaloacétate peut être transformé :

- en malate par la malate deshydrogénase (MDH) mitochondriale avec consommation de NADH,H+. Le malate, qui possède un transporteur, passe dans le cytosol où une autre MDH assure la transformation inverse en reformant de l'oxaloacétate et du NADH,H+. Ce système de transport assure la fourniture par la mitochondrie de l'équivalent réducteur nécessaire pour l'incorporation des trois carbones dans la gluconéogenèse ;
- en aspartate par l'aspartate aminotransférase mitochondriale (ASAT). L'aspartate qui possède un transporteur passe dans le cytosol où une autre ASAT assure la transamination inverse en redonnant l'oxaloacétate pour la gluconéogenèse. Dans ce cas, le NADH,H+ nécessaire doit être fourni par un autre moyen. L'aspartate ainsi transféré peut également se condenser dans le cytosol avec la citrulline pour former l'argininosuccinate. L'argininosuccinate lyase catalyse ensuite la coupure non hydrolytique de l'argininosuccinate avec formation d'arginine, destinée à l'uréogenèse, et de fumarate qui, par hydratation, conduit au malate transformé en oxaloacétate par la MDH avec formation de NADH,H+. L'oxaloacétate rejoint ainsi la gluconéogenèse en apportant les équivalents réducteurs indispensables. Dans les deux cas, la gluconéogenèse et l'uréogenèse sont associées, soit directement par l'aspartate qui fournit un $NH_2$ à l'uréogenèse, soit indirectement par le couple $\alpha$-cétoglutarate-glutamate qui collecte les $NH_2$ des acides aminés et constitue un substrat important de l'uréogenèse.

Le *lactate* et l'*alanine* représentent les principaux substrats glucoformateurs. Ils proviennent des tissus périphériques (le muscle et le globule rouge en particulier) et assurent le transport au foie, soit des équivalents réducteurs de la glycolyse anaérobie (cycle de Cori), soit des groupements amines provenant du catabolisme des acides aminés. Dans le cytosol de l'hépatocyte, ils sont tous les deux transformés en pyruvate. Le lactate par la LDH assure la formation de NADH,H+ et apporte l'équivalent réducteur nécessaire pour son incorporation dans la gluconéogenèse. Dans le cas de l'alanine, c'est l'alanine aminotransférase (ALAT) qui la transforme en pyruvate, donc sans apport d'équivalent réducteur, mais en fournissant un équivalent $NH_2$ à l'uréogenèse. Le pyruvate ainsi formé diffuse dans la mitochondrie en servant de contre-transport pour la sortie des corps cétoniques qui sont produits en grande quantité en période de gluconéogenèse. Le pyruvate est transformé en oxaloacétate, comme nous l'avons décrit plus haut. Quand le pyruvate provient de la transamination de l'alaline, il est nécessaire de fournir au cytosol un équivalent réducteur pour la suite de la gluconéogenèse – l'oxaloacétate est transféré sous forme de malate. Quand le pyruvate provient du lactate, l'équivalent réducteur n'est pas nécessaire et l'oxaloacétate est transféré sous forme d'aspartate. Le lactate contribue donc à l'élimination de l'azote fourni par le catabolisme des acides aminés glucoformateurs autres que l'alanine.
Parmi les *autres substrats glucoformateurs*, signalons le *glycérol* qui est libéré par les adipocytes pendant la lipolyse en même temps que les acides gras non estérifiés. En effet, l'adipocyte ne possédant pas de glycérol kinase ne peut pas réutiliser le glycérol pour la synthèse du glycérol phosphate nécessaire pour former les triacylglycérols. Celui-ci doit provenir de la réduction de la dihydroxyacétone phosphate de la glycolyse. L'hépatocyte, qui possède une glycérol kinase, épure le glycérol du plasma, le transforme en glycérol phosphate qui est soit réduit par la glycérol phosphate déshydrogénase avec formation d'un NADH,H+ et de dihydroxyacétone phosphate qui rejoint la gluconéogenèse, soit directement utilisé pour la synthèse des triglycérides.
À l'état physiologique, le métabolisme du *fructose* est presque exclusivement hépatocytaire et rejoint la gluconéogenèse au niveau des trioses phosphates.
Le métabolisme des *acides aminés glucoformateurs* rejoint la gluconéogenèse soit par le pyruvate, soit par un des intermédiaires du cycle de Krebs, par exemple : l'alanine, la sérine et la cystéine forment du pyruvate ; l'aspartate de l'oxaloacétate ; le glutamate, l'ornithine et la proline de l'α-cétoglutarate, l'isoleucine et la valine du succinyl-CoA, la tyrosine et la phénylalanine du fumarate. Ces intermédiaires du cycle de Krebs se transforment ensuite en malate-oxaloacétate-aspartate. Toute voie anaplérotique, qui par définition fournit des intermédiaires au cycle de Krebs, participe à la gluconéogenèse à la condition que le nombre de carbones fournis à ce cycle soit supérieur au nombre de décarboxylations réalisées avant d'atteindre l'étape malate-oxaloacétate. C'est ainsi que dans le règne animal, *l'acétyl-CoA n'est pas glucoformateur*.
Enfin, il est très important de signaler que la gluconéogenèse implique un déplacement de l'équilibre malate-oxaloacétate dans le sens inverse de celui du cycle de Krebs. De plus, elle consomme l'oxaloacétate qui ainsi n'est plus disponible pour se condenser avec l'acétyl-CoA.

### b) Bilan de la gluconéogenèse

À partir du pyruvate, on peut écrire :

$$2Pyr + 4ATP + 2GTP + 2NADH,H^+ \rightarrow Glc + 4ADP + 2GDP + 6Pi + 2NAD^+$$

À partir des autres substrats, il faut tenir compte du bilan énergétique de toutes les étapes avant d'atteindre le malate et éventuellement de l'énergie nécessaire pour éliminer l'azote.

La gluconéogenèse consomme de l'ATP qui provient essentiellement du catabolisme des acides gras. La transformation d'acyl-CoA en acétyl-CoA dans la mitochondrie produit un grand nombre de coenzymes réduits. L'hépatocyte étant régulièrement oxygéné, la chaîne respiratoire régénère des coenzymes oxydés et fournit les ATP nécessaires. L'acétyl-CoA ne pouvant pas être catabolisé dans le cycle de Krebs s'accumule et se trouve orienté vers la formation de corps cétoniques (acétoacétate et β-hydroxybutyrate). Gluconéogenèse et cétogenèse sont obligatoirement associées dans toutes les situations physiologiques et pathologiques.

### c) Régulation de la gluconéogenèse (*fig. 1*)

La régulation de la gluconéogenèse hépatique s'effectue aux niveaux de quatre carrefours principaux : fructose-1,6-bisphosphatase 1 (FBPase1)/phosphofructokinase 1 (PFK1), pyruvate kinase, pyruvate carboxylase et pyruvate deshydrogénase.

Dans le cytosol, la régulation la plus importante se trouve au niveau de la *fructose-1,6-bisphosphatase 1* (FBPase1) et de la *phosphofructokinase 1* (PFK1) qui catalysent la transformation de Fru 6-P en Fru 1,6-BiP et inversement. Il se forme ce qu'on appelle un « cycle futile » car si les deux enzymes fonctionnaient sans contrôle, on aboutirait à une consommation d'ATP sans utilité. Ces enzymes sont en fait parfaitement régulées par les mêmes modulateurs mais dans des sens opposés. Le principal niveau de contrôle est allostérique.

Comme dans tous les tissus, la charge énergétique pourrait théoriquement intervenir : la PFK1 est inhibée par une forte concentration en ATP et activée par une forte concentration en ADP et en AMP. Inversement, une forte concentration en ATP active la FBPase1 et une forte concentration en AMP l'inhibe. Toutefois, dans l'hépatocyte, la charge énergétique est remarquablement stable et cette régulation n'intervient que dans des cas exceptionnels.

Le modulateur allostérique principal est le fructose-2,6-bisphosphate (Fru 2,6-BiP), qui se comporte comme un modulateur positif de la PFK1 et négatif de la FBPase1.

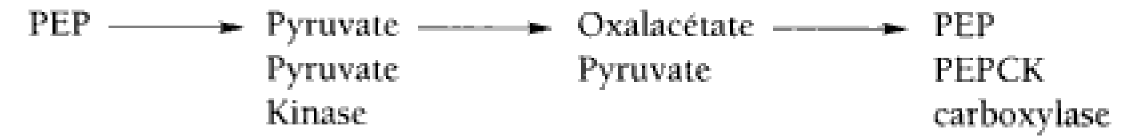
NB : ne pas confondre Fru 1,6-BiP et Fru 2,6-BiP. Le premier est un métabolite présent à concentration millimolaire. Le second est un modulateur allostérique présent à concentration micromolaire.

La présence de Fru 2,6-BiP exprime une abondance en glucose et entraîne, par modulation des activités enzymatiques, un arrêt de la gluconéogenèse et une possibilité de glycolyse. Inversement, son absence signifie un manque de glucose et provoque une stimulation de la gluconéogenèse et une inhibition de la glycolyse. Une concentration élevée en Fru 2,6-BiP porte donc un message inverse de celui du glucagon qui correspond à une stimulation hyperglycémiante pour répondre à

un manque de glucose. Cela s'explique par la régulation de la synthèse et de la dégradation du Fru 2,6-BiP. La synthèse du Fru 2,6-BiP est catalysée par une phosphofructokinase 2 (PKF2) (différente de la PFK1 de la glycolyse). Sa destruction est catalysée par une fructose bisphosphatase 2 (FBPase 2) différente de la FDPase 1 de la gluconéogenèse. Chose assez rare, les deux activités enzymatiques sont portées par une même protéine. Cette protéine enzymatique est régulée par phosphorylation-déphosphorylation, selon un schéma classique, faisant intervenir la protéine kinase A (AMPc dépendante) et une phosphoprotéine phosphatase (PP). En présence d'AMPc, deuxième messager du glucagon, la protéine kinase A est active et la PFK2-FBPase 2 phosphorylée (en fait l'isoforme hépatique) ne manifeste que son activité FBPase 2 – et hydrolyse le Fru 2,6-BiP. La levée de la modulation négative de la FBPase conduit à une stimulation de la gluconéogenèse. Le glucagon stimule donc la gluconéogenèse comme il stimule la glycogénolyse, par l'intermédiaire de la même protéine kinase A.

En absence de stimulation par le glucagon (rapport insulinémie-glucagonémie élevé), la protéine kinase A est inactive, la PFK2-FBPase 2 est sous forme non phosphorylée et ne manifeste alors que son activité PFK2, ce qui entraîne la synthèse du Fru 2,6-BiP qui inhibe la FBPase 1 et, par voie de conséquence, la gluconéogenèse.

Le deuxième point de régulation de la gluconéogenèse est sous la dépendance de la *pyruvate kinase* qui transforme le PEP en pyruvate et qui doit absolument être inhibée en période de gluconéogenèse. En effet, l'équilibre glycéraldéhyde 3-phosphate ↔ 1,3 diphosphoglycérate ↔ 3-phosphoglycérate (3PG) est très défavorable à la gluconéogenèse puisqu'il présente une constante d'équilibre très en faveur de la formation de 3PG (Keq = 0,01). Pour réaliser la gluconéogenèse, il faut alors une forte concentration en 3PG et une faible concentration en glycéraldéhyde 3-phosphate. La suite des réactions de cette voie métabolique, 3-P glycérate (3PG) ↔ 2-P glycérate (2PG) ↔ Phosphoénol pyruvate (PEP), est, elle, bien équilibrée. En période de gluconéogenèse, il faut une concentration élevée en phosphoénol pyruvate. Il importe alors de réguler le cycle futile :




Dans l'hépatocyte, l'isoforme L de la pyruvate kinase est phosphorylable par la protéine kinase A (activée par le glucagon). La forme phosphorylée de la pyruvate kinase correspond à la forme inactive de l'enzyme. Par ailleurs, la pyruvate kinase L est également régulable par allostérie : le modulateur positif est le Fru 1,6-BiP et les modulateurs négatifs sont le citrate, l'ATP et l'alanine. En période de gluconéogenèse, la pyruvate kinase est par conséquent inactive et le PEP sera dès lors transformé en 3-P glycérate puis en glycéraldéhyde 3-P.

Le troisième point de régulation de la gluconéogenèse est situé au niveau du carrefour du pyruvate. Dans la mitochondrie, le pyruvate est orienté soit vers la gluconéogenèse *via* la pyruvate carboxylase, soit vers l'oxydation *via* la pyruvate deshydrogénase. En situation de jeûne, la pyruvate carboxylase, première étape de la gluconéogenèse, est activée par allostérie alors que la pyruvate deshydrogénase est inhibée par une phosphorylation induite par des mécanismes d'allostérie.

Du fait de la β-oxydation des acides gras pendant le jeûne, l'acétyl-CoA s'accumule. C'est un modulateur allostérique positif de la *pyruvate carboxylase*. De fortes concentrations mitochondriales en acétyl-CoA, en ATP et en NADH,$H^+$, témoignent d'un catabolisme abondant d'acyl-CoA, condition indispensable pour fournir l'énergie et les équivalents réducteurs à la gluconéogenèse. Ces trois molécules se comportent par ailleurs comme des modulateurs allostériques positifs de la pyruvate déshydrogénase kinase, enzyme responsable de la phosporylation de la pyruvate deshydrogénase. La forme phosphorylée de la PDH est inactive. Dans les situations d'hyperglycémie sous l'influence de l'insuline, la lipolyse et la β-oxydation sont freinées, la concentration intramitochondriale en acetyl-CoA, ATP et NADH,$H^+$ chute. Par conséquent, la pyruvate carboxylase n'est plus activée et la pyruvate deshydrogénase déphosphorylée n'est plus verrouillée. Le glucose est alors oxydé au travers du cycle de Krebs *via* le pyruvate.
Enfin, l'*isocitrate déshydrogénase* peut également participer à la régulation de la gluconéogenèse. Cette enzyme du cycle de Krebs, qui transforme l'isocitrate en α-cétoglutarate (première étape de décarboxylation), est inhibée par de fortes concentrations en ATP et en NADH,$H^+$. En période de gluconéogenèse, ces deux coenzymes doivent être fournies en grande quantité par la mitochondrie. L'inhibition de cette étape provoque une accumulation de citrate et d'oxalacétate, qui peuvent ainsi s'orienter vers la gluconéogenèse, ainsi que d'acétyl-CoA qui s'oriente vers la cétogenèse. Malgré l'inhibition de l'isocitrate déshydrogénase, les étapes du cycle de Krebs entre l'α-cétoglurate et le malate restent parfaitement fonctionnelles et peuvent ainsi orienter les substrats glucoformateurs vers le malate-oxaloacétate-aspartate.
Indépendamment de ces mécanismes de régulation immédiate (allostérie, phosphorylation-déphosphorylation), la gluconéogenèse est également régulée à long terme par des mécanismes de régulation transcriptionnelle par des hormones. Le glucagon et les glucocorticoïdes induisent la biosynthèse des enzymes spécifiques de la gluconéogenèse : pyruvate carboxylase (PC), phosphoénol pyruvate carboxykinase (PEPCK), fructose-1,6-bisphosphatase, glucose-6-phosphatase, ce qui provoque une augmentation de la concentration des enzymes dans l'hépatocyte, et ainsi de leur activité spécifique (nombre de molécules de substrat transformées par minute et par milligramme de protéines). L'insuline s'oppose à ce phénomène. Ce contrôle de la synthèse de ces enzymes ne se manifeste qu'après un délai de plusieurs heures, voire de plusieurs jours. Il agit dans le même sens que les effets rapides de ces hormones et les consolide.

## B. Régulation des voies métaboliques consommant le glucose prélevé dans la circulation sanguine

### 1. Glycolyse des tissus périphériques

#### a) Considérations métaboliques

La plupart des tissus prélèvent dans la circulation le glucose dont ils ont besoin pour assurer leur couverture énergétique. Toutefois, il faut bien considérer deux

types de tissus : les tissus glucodépendants, d'une part, pour lesquels le glucose est la source quasi exclusive d'énergie, et qui par ailleurs sont caractérisés par une consommation régulière et continue de glucose. Dans la majorité de ces tissus, le nombre de transporteurs de glucose insérés dans la membrane est suffisant pour assurer l'influx de glucose nécessaire et celui-ci n'est pas modifié par la présence d'insuline. Ces tissus sont dits « insulino-indépendants pour le glucose. » Ils sont très sensibles à l'hypo- ou l'hyperglycémie. C'est le cas en tout premier lieu du cerveau, mais également celui des hématies, des leucocytes, de la médullaire rénale, de la rétine… Dans ces tissus, il n'y a pas à proprement parler de régulation du flux glycolytique. D'autre part, d'autres tissus peuvent certes utiliser le glucose, mais aussi d'autres sources énergétiques, et plus précisément les acides gras. Les deux tissus périphériques les plus importants de ce groupe, en termes de prélèvement de glucose – le tissu adipeux et le muscle squelettique – ne peuvent prélever du glucose que lorsque la production d'insuline est suffisante et, dès lors, essentiellement en période postprandiale. En effet, ces tissus sont insulinodépendants pour le glucose, comme nous l'avons vu précédemment. Dans ces cellules, l'insuline contrôle l'influx de glucose et par là même les possibilités de glycolyse.

### b) Régulation de la glycolyse (*fig. 1*)

En fonction de ce qui vient d'être dit, la régulation de la glycolyse n'est envisagée que pour le tissu adipeux et le muscle squelettique.

Dans les tissus périphériques, la possibilité de glycolyse dépend en premier lieu de la disponibilité en glucose-6-P. Au niveau du muscle, celui-ci provient essentiellement de la glycogénolyse. Ainsi, dans un muscle squelettique, l'élévation de la concentration en calcium du cytosol (de $10^7$ à $10^5$ mol/L) déclenche en même temps la contraction musculaire qui consomme de l'ATP et la glycogénolyse qui apporte le glucose-6-P à la glycolyse. Dans le premier phénomène, le calcium se fixe sur la troponine C, ce qui lève l'inhibition par la troponine I et permet l'activité ATPasique de la myosine, ce qui déclenche la contraction. Dans le second phénomène, le calcium qui se fixe sur la sous-unité delta (calmoduline) de la phosphorylase kinase, l'active. Cette dernière, en phosphorylant la glycogène phosphorylase, l'active et déclenche la glycogénolyse avec libération de glucose-1-P. Ce dernier est isomérisé en glucose-6-P par la phosphohexomutase (réaction équilibrée). Le glucose-6-P ainsi formé est disponible pour la glycolyse à un moment où il est urgent de remplacer l'ATP consommé.

Au niveau du tissu adipeux, le glucose-6-P provient essentiellement de l'influx du glucose dans la cellule en période postprandiale.

Dans le muscle, comme dans le tissu adipeux, il n'existe qu'une seule étape de régulation. Il s'agit de la transformation de Fru 6-P en Fru 1,6-BiP catalysée par la phosphofructose kinase 1 (PFK1). La régulation allostérique de la PFK1 contrôle parfaitement la glycolyse en fonction des besoins en énergie.

Plusieurs modulateurs allostériques peuvent intervenir. Le premier type de modulation fait intervenir les nucléotides phosphates et la charge énergétique. Cette modulation est la plus importante au niveau du muscle. La PFK1 est modulée négativement par l'ATP et positivement par l'ADP et l'AMP. Cela revient à dire que c'est la concentration locale en ATP ou en ADP qui contrôle l'activité de la PFK1 et par là l'intensité de la glycolyse, ce qui a pour objectif de maintenir la concentration en ATP à un niveau satisfaisant.

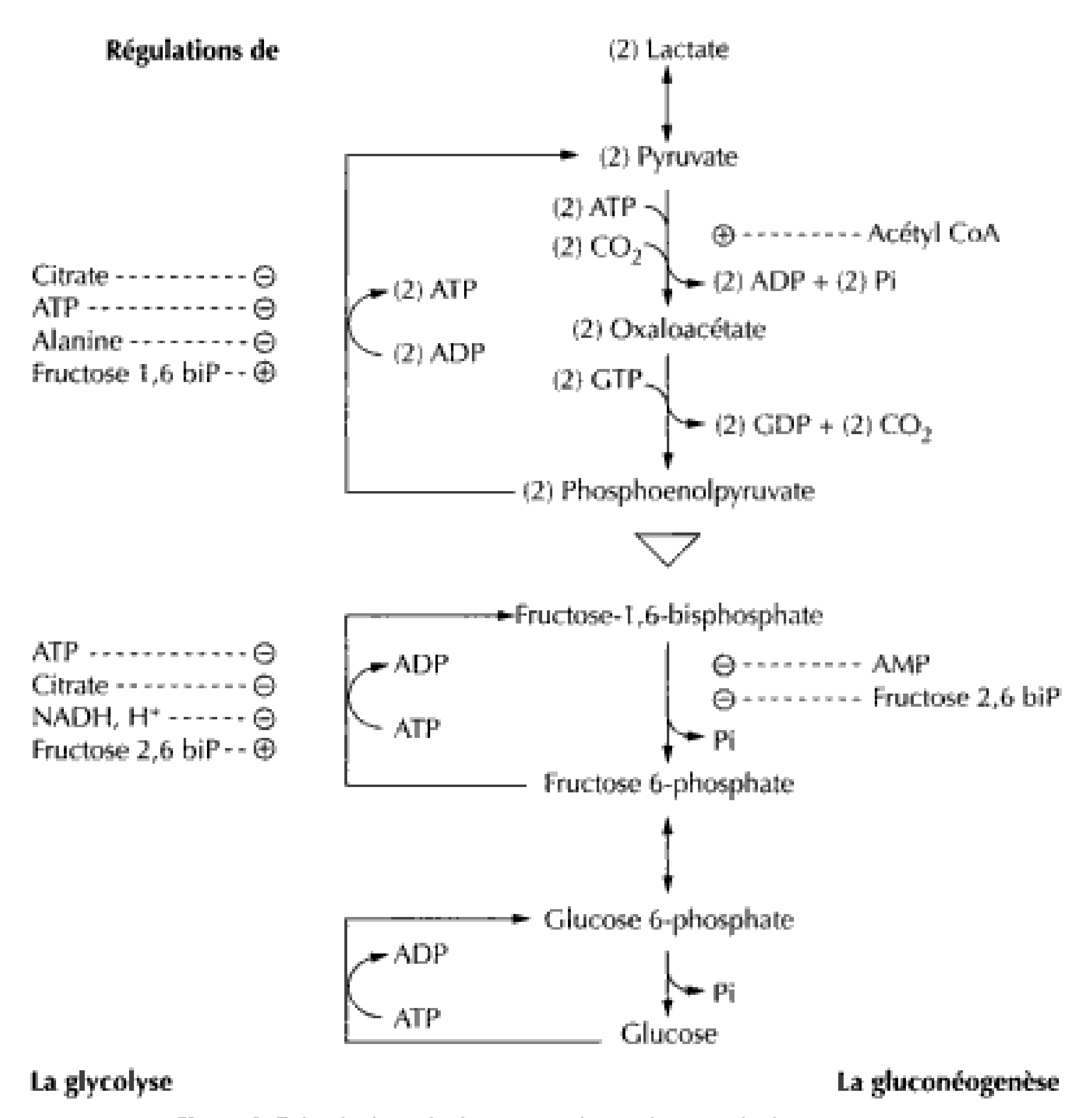



**Figure 1.** Régulation de la gluconéogenèse et de la glycolyse

Dans un muscle au repos, la concentration en ATP fournie par la mitochondrie est suffisante pour inhiber la PFK1 et limiter la glycolyse. La contraction musculaire est associée à une hydrolyse de l'ATP en ADP, ce qui provoque la diminution de la charge énergétique et, automatiquement, l'activation de la PFK1, et ainsi de la glycolyse. La glycolyse anaérobie produit deux ATP par glucose et permet de répondre à un besoin urgent en ATP en début d'effort musculaire.

Cette même régulation de la PFK 1 explique pourquoi les acides gras sont métabolisés en priorité dans les cellules musculaires. Les acides gras non estérifiés sont absorbés en fonction de leur concentration plasmatique, puis sont oxydés dans la mitochondrie avec formation de coenzymes réduits qui approvisionnent la chaîne respiratoire. La grande quantité d'ATP fournie (129 ATP par palmitate) inhibe la PFK1, et ainsi la glycolyse. Cette glycolyse a pour rôle de compléter l'apport en ATP de la mitochondrie pour le maintien de la charge énergétique du cytosol à un niveau optimal. Occasionnellement, elle compense instantanément un manque de cet apport d'ATP mitochondrial. Par exemple, au début d'un effort musculaire, la glycolyse fournit instantanément l'ATP nécessaire en attendant que l'accélération de la circulation sanguine apporte suffisamment d'oxygène aux mitochondries qui peuvent alors fournir, à partir du catabolisme des acides gras, l'essentiel de l'ATP nécessaire pour un effort plus prolongé.

Par ailleurs, quand un tissu se trouve en anaérobie, la chaîne respiratoire ne peut plus fonctionner et la fourniture d'ATP est interrompue. Automatiquement, la PFK1 est activée et la glycolyse accélérée. Cela explique l'augmentation de la consommation de glucose par une cellule placée en anaérobiose : effet Pasteur.
Si la charge énergétique constitue l'essentiel de la régulation de la PFK1 dans le muscle, il convient cependant d'évoquer d'autres possibilités. De façon complémentaire, dans le muscle, le citrate se comporte comme un inhibiteur allostérique de la PFK1, et le fructose-2,6-bisphosphate comme un activateur allostérique de cette même enzyme. Cette dernière régulation ne semble pas essentielle au niveau musculaire. Dans cet organe comme dans le foie, la concentration de fructose-2,6-biphosphate est modulée par les activités respectives de la PFK2 et de la fructose bisphosphatase 2. Cependant, dans cet organe, et par opposition avec ce que nous avons dit sur le foie, la forme phosphorylée de ce complexe enzymatique stimule l'activité PFK2, expliquant ainsi qu'en présence de catécholamines (exercice musculaire) la glycolyse soit activée.
La PFK1 musculaire est également directement activée par la fixation de $Ca^{2+}$ dont la concentration cytosolique est augmentée en cas d'exercice musculaire.
Dans le tissu adipeux, la régulation de la glycolyse au niveau de la PFK1 est comparable à celle du foie avec un rôle activateur essentiel joué par le Fru 2-6 BiP (voir « *Régulation de la gluconéogenèse dans le foie* »). En présence d'insuline, la pénétration de glucose est largement induite, et l'état non phosphorylé du complexe PFK2-FBPase 2, comme dans le foie, favorise l'activité kinase, ce qui augmente la quantité de Fru 2-BiP et stimule l'activité de la PFK1 et la glycolyse. Par ailleurs, également comme dans le foie, le citrate se comporte comme un inhibiteur allostérique de la PFK1.
En outre, les hormones contrôlent la synthèse des enzymes de la glycolyse (hexokinase, PFK1, pyruvate kinase notamment). Par exemple, les glucocorticoïdes inhibent leur synthèse et donc, après quelques heures, limitent la glycolyse. L'insuline s'oppose à cet effet et par conséquent favorise la consommation de glucose. Cela explique les effets à long terme de ces hormones.

### c) Glycogénogenèse hépatique

Un rapport insulinémie-glucagonémie élevé active la glycogène synthétase et inhibe la glycogène phosphorylase, conséquence d'une déphosphorylation des enzymes. Compte tenu des caractéristiques de GLUT2 et la glucokinase précédemment énoncées, la glycogénogenèse n'est significative qu'en situation d'hyperglycémie. En prélevant du glucose de la circulation sanguine, les hépatocytes contribuent alors à limiter l'hyperglycémie postprandiale.

### d) Glycogénogenèse musculaire

Pendant la période postprandiale et en l'absence d'exercice physique, elle contribue également à rétablir la glycémie à son taux basal. Les nutriments absorbés par l'intestin et déversés dans la veine cave doivent obligatoirement passer par le foie avant d'accéder aux tissus périphériques. C'est pourquoi la mise en réserve de glucose sous forme de glycogène se fait en priorité par les hépatocytes, les tissus musculaires n'assurant qu'un complément. L'hyperinsulinisme relatif en période postprandiale provoque la translocation de GLUT4 vers la membrane plasmique des cellules musculaires. L'influx important de glucose contribue efficacement à la

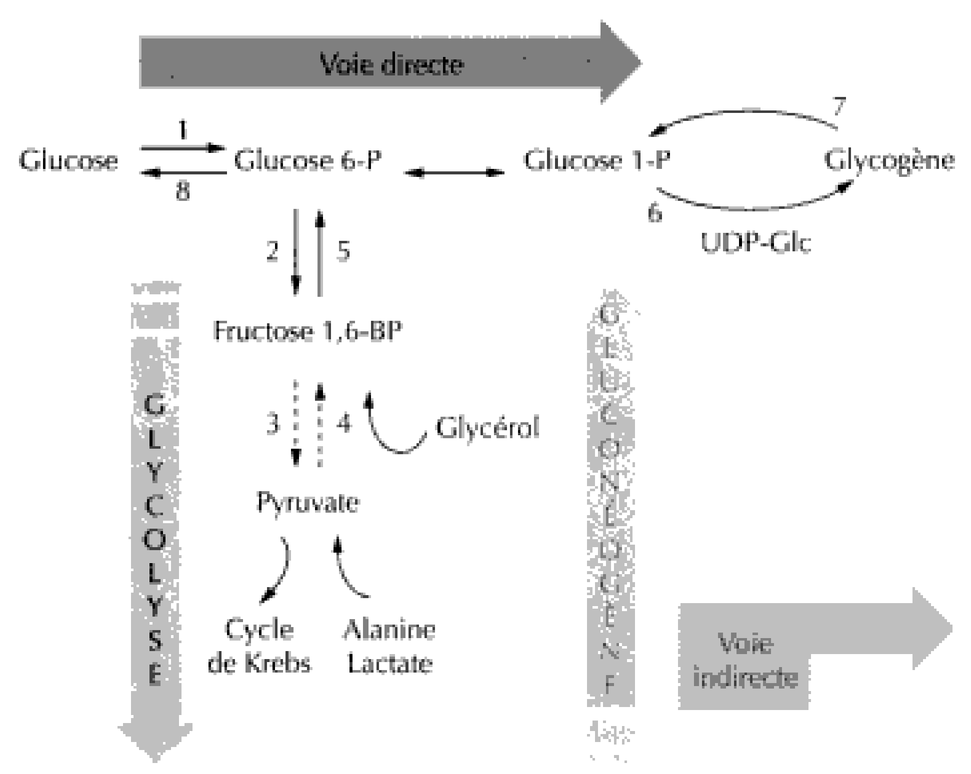



**Figure 2.** Les étapes clés du métabolisme du glucose dans l'hépatocyte : 1. glucokinase ; 2. phosphofructokinase 1 ; 3. pyruvate kinase ; 4. pyruvate carboxylase ; 5. fructose-1,6-bisphosphatase ; 6. glycogène synthase ; 7. glycogène phosphorylase ; 8. glucose-6-phosphatase

normalisation de la glycémie. Compte tenu de la masse importante du tissu musculaire, l'intervention de cette glycogénogenèse, bien que complémentaire, est très significative.

### e) Glycogénolyse musculaire

Elle ne contribue pas directement au maintien de la glycémie car les tissus périphériques ne possèdent pas de glucose-6-phosphatase. En fournissant très rapidement le glucose-6-phosphate nécessaire à la glycolyse, elle limite pendant un bref délai les prélèvements de glucose dans la circulation sanguine.
La glycogène phosphorylase est phosphorylée par la phosphorylase kinase activée sous l'effet de l'augmentation de la concentration en calcium nécessaire pour le déclenchement de la contraction musculaire. Les catécholamines, par l'intermédiaire des récepteurs β adrénergiques, entraînent une augmentation de la concentration en AMPc. La protéine kinase A activée phosphoryle les sous-unités α et β de la phosphorylase kinase, qui devient plus sensible au calcium.
La totalité du glycogène musculaire représente une réserve de 100 à 150 g selon l'état nutritionnel et l'entraînement. Lors d'un effort violent, les besoins en glucose peuvent atteindre 5 g/minute. Toutefois, l'utilisation de cette réserve se trouve limitée par le fait que, par manque de glucose-6-phosphatase, le glycogène n'est utilisable que localement, cellule par cellule. Avant l'épuisement du glycogène musculaire, c'est l'influx de glucose sanguin qui doit prendre rapidement le relais et la glycogénolyse hépatique doit maintenir la glycémie car la totalité du glucose extracellulaire ne représente qu'environ 15 g. Quand l'effort se prolonge, le métabolisme des acides gras doit fournir l'énergie nécessaire.

# IV. Régulations hormonales de la glycémie

La régulation de la glycémie se réalise constamment par l'action opposée des hormones hypo- et hyperglycémiantes. Les variations du rapport des concentrations sanguines de ces hormones antagonistes adaptent ces régulations aux besoins de l'organisme.

## A. Hormones hypoglycémiantes

### 1. Insuline

*L'insuline* est la seule hormone hypoglycémiante majeure. Du fait de ses variations de concentration sanguine, elle joue un rôle prédominant en s'opposant aux effets de toutes les hormones hyperglycémiantes. Toutes les cellules expriment dans leur membrane le récepteur de l'insuline qui appartient à la famille des récepteurs à tyrosine kinase. La fixation de l'insuline sur la sous-unité α extracellulaire lève l'inhibition de l'activité tyrosine kinase localisée dans la partie intracellulaire de la sous-unité β. L'autophosphorylation du récepteur stabilise la forme active de la tyrosine kinase et lance la transduction du signal insuline dans la cellule.
Le plus souvent, les enzymes régulées par l'insuline dans les métabolismes concernés se trouvent déphosphorylées lors de l'activation de leur récepteur par des mécanismes de transduction assez complexes. Certaines de ces régulations se manifestent en quelques secondes (augmentation de l'influx de glucose dans les cellules insulinodépendantes), d'autres en quelques minutes (activation de la glycogène synthétase et de l'acétyl-CoA carboxylase, inactivation de la glycogène phosphorylase, de la lipase hormonosensible des adipocytes). Enfin, d'autres régulations comme celle de la synthèse des protéines, notamment de certaines enzymes, se manifestent au bout de quelques heures. La plupart des activités de l'insuline contribuent directement ou indirectement à provoquer une hypoglycémie :

- stimule la capture du glucose circulant dans les tissus insulinodépendants ;
- inhibe l'expression (la synthèse) des enzymes spécifiques de la gluconéogenèse hépatocytaire ;
- induit l'expression des enzymes de la glycolyse ;
- stimule la glycogénogenèse hépatocytaire et périphérique.

De plus, l'insuline est le principal verrou de la lipolyse (hydrolyse du triacylglycérol en glycérol et acides gras) dans les adipocytes, avec pour conséquence l'arrêt de la sécrétion d'acides gras (substrats énergétiques) et de glycérol (substrat glucoformateur). Par ailleurs, l'activation de l'acétyl CoA carboxylase des adipocytes stimule la synthèse des acides gras qui sont orientés vers la mise en réserve sous forme de triacylglycérol. Dans l'hépatocyte, sous l'influence de l'insuline, la forte concentration en malonyl-CoA produit par l'acétyl-CoA carboxylase, inhibe la carnitine palmitoyl transférase 1 (CPT1). Les acylCoA ne peuvent plus pénétrer dans la mitochondrie et le catabolisme des acides gras est alors interrompu. Cela explique l'effet anticétogène de l'insuline.

### 2. Insuline like growth factor (igf-i – somatomédine c)

Ce facteur de croissance, sécrété par le foie, se lie à un récepteur de type tyrosine kinase de structure très voisine de celle du récepteur de l'insuline. À l'état physiologique, la sécrétion de l'IGF-I par le foie, bien qu'importante (concentration sanguine de 0,1 à 1 mg/L dès lors plusieurs centaines de fois supérieure à celle de l'insuline), a toutefois un impact très restreint sur la régulation de la glycémie.

## B. Hormones hyperglycémiantes

### 1. Glucagon

Il joue un rôle prépondérant dans la régulation de la glycémie. Son action s'exerce massivement sur l'hépatocyte qui exprime un grand nombre de récepteurs membranaires pour cette hormone. L'action du glucagon sur les tissus périphériques est beaucoup plus limitée et plus sélective.

Le récepteur du glucagon est de la famille des récepteurs, couplée aux protéines G hétérotrimériques. La liaison de l'hormone à son récepteur provoque l'activation d'une adénylate cyclase, l'augmentation de la concentration en AMPc et l'activation de la protéine kinase A. La phosphorylation de très nombreuses enzymes par cette protéine kinase réalise une régulation coordonnée des différents métabolismes pour aboutir à une augmentation de la glycémie.

Ainsi, l'activation de la glycogène phosphorylase et l'inhibition de la glycogène synthétase hépatocytaire stimule la glycogénolyse et la sécrétion rapide de glucose grâce à la glucose-6-phosphatase.

Par ailleurs, dans le foie, l'inhibition allostérique de la pyruvate kinase isoforme L et la levée de l'inhibition de la fructose-1,6-bisphosphatase par la diminution de la concentration en fructose-2,6-biphosphate induite par le glucagon stimule la gluconéogenèse.

Enfin, l'inhibition de l'acétyl-CoA carboxylase entraîne la diminution de la concentration en malonyl-CoA et la levée de l'inhibition de la CPT1. Les acylCoA sont ainsi orientés vers la mitochondrie et le catabolisme des acides gras, avec production de coenzymes réduits et d'ATP nécessaires pour la gluconéogenèse. L'acétyl-CoA produit en grande quantité ne peut dans ces conditions physiologiques être catabolisé dans le cycle de Krebs, d'où une cétogenèse accrue. Ces corps cétoniques sécrétés par l'hépatocyte sont une source d'énergie consommée en priorité par certains tissus périphériques qui ne peuvent utiliser les acides gras et limitent ainsi les besoins en glucose.

L'activation de la lipase hormonosensible des adipocytes stimule la sécrétion d'acides gras non estérifiés. Les acides gras disponibles en grande quantité sont catabolisés en priorité par les tissus musculaires limitant ainsi la glycolyse et les besoins en glucose. L'excès d'acides gras est capturé par les hépatocytes qui les catabolisent.

## 2. Glucocorticoïdes

Ils induisent la synthèse des enzymes spécifiques de la gluconéogenèse, ce qui explique leurs effets secondaires « diabétogènes ». L'insuline s'oppose à cette induction. Par ailleurs, les glucocorticoïdes contribuent très activement à la mobilisation rapide des substrats glucoformateurs provenant du catabolisme de constituants, surtout protéiques, des tissus périphériques (amaigrissement pendant un jeûne prolongé, diabète insulinodépendant insuffisamment traité…).

## 3. Catécholamines

Elles agissent surtout sur les tissus périphériques. Tous les tissus qui expriment des récepteurs β adrénergiques (récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques) répondent aux catécholamines par une augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc et l'activation de la protéine kinase A. Cela se traduit surtout par une glycogénolyse fournissant localement du glucose-6-phosphate pour la glycolyse. Pendant la contraction musculaire, cette stimulation renforce les mécanismes calcium-dépendants et contribue à la fourniture rapide de l'énergie nécessaire.
D'autres hormones, comme la vasopressine ou l'angiotensine II, entraînent une élévation de la concentration intracellulaire en calcium et pourraient ainsi intervenir dans la régulation de la glycémie. L'hormone de croissance (GH), pour sa part, exerce des effets hyperglycémiants : elle active la gluconéogenèse hépatique et réduit la glycolyse musculaire.

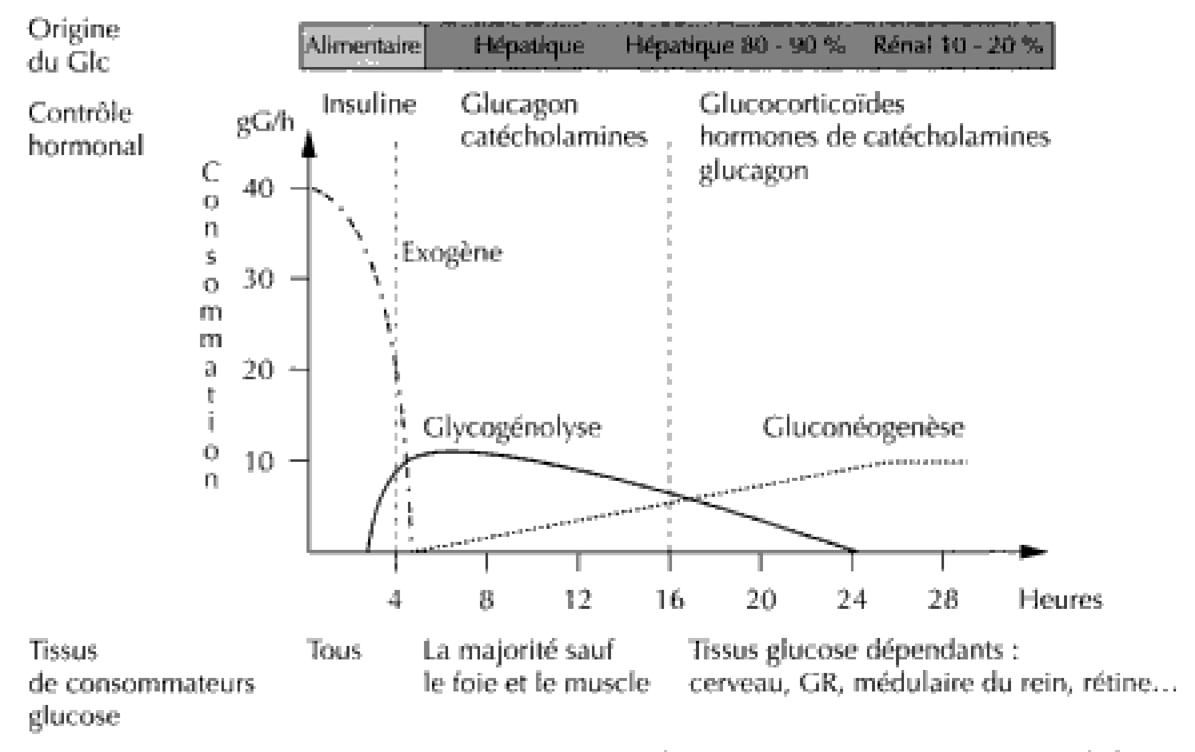



**Figure 3.** Mécanismes de régulation de la glycémie après un repas et au cours du jeûne

# V. Régulations des sécrétions hormonales participant à la régulation de la glycémie

## A. Régulation hyperglycémiante

Le principal mécanisme identifié implique des neurones du système nerveux central, plus précisément de l'hypothalamus. Ces cellules se comportent comme des senseurs de la glycémie. Elles expriment le transporteur GLUT4 et sont donc insulinodépendantes pour l'influx de glucose. Elles réagissent par conséquent soit à un hypoinsulinisme, soit à une hypoglycémie. Pour les centres régulateurs insulinosensibles, ce défaut de glucose intracellulaire est ressenti comme la conséquence d'une hypoglycémie et déclenche au niveau de l'hypothalamus une sécrétion de divers *releasing factors* à l'origine d'une réaction hyperglycémiante, soit directement, soit indirectement, par l'intermédiaire de l'antéhypophyse.
La plupart des sécrétions endocriniennes se trouvent augmentées : glucagon, catécholamines, cortisol, ACTH, hormone de croissance, etc., modifiant l'état de stimulation des métabolismes des différents tissus.
Toutefois, dans le cas du glucagon, un contrôle local de la sécrétion par les cellules α du pancréas directement réalisé par le glucose ou indirectement par le biais de l'insuline est également envisagé par certains auteurs.

## B. Réaction hypoglycémiante

À l'état physiologique, c'est l'hyperglycémie qui déclenche la sécrétion d'insuline par les cellules β des îlots de Langerhans. L'insuline sécrétée contribue par son action à la normalisation de la glycémie.
Les cellules β des îlots de Langerhans expriment la glucokinase et GLUT2 comme dans les hépatocytes. Du fait de l'affinité élevée de cette enzyme pour le glucose et du $k_d$ élevé de ce transporteur, la glycolyse des cellules β est faible en normoglycémie et augmente très significativement en période d'hyperglycémie. Dès lors, le métabolisme du glucose dans les cellules β régule la sécrétion de l'insuline. Par ailleurs, des mécanismes calcium-dépendants pourraient également intervenir.
La sécrétion d'insuline par les cellules β se réalise par exocytose de granulations lors d'une stimulation hyperglycémiante.

# Réactions générales du catabolisme des acides aminés

J.-P. DE BANDT, L. CYNOBER [1]
Laboratoire de biochimie, Hôtel-Dieu, AP-HP, Paris.
Laboratoire de biologie de la nutrition, EA 2498, UFR de pharmacie, Paris-V.



1. Pour toute question relative à ce chapitre : luc.cynober@htd.aphp.fr.

*Les acides aminés sont des molécules caractérisées par la présence d'un groupement aminé en position α d'un groupement carboxylique, chaque acide aminé se distinguant des autres par la structure de son radical (aliphatique, cyclique, etc.). Il existe deux groupes d'acides aminés, déterminés par la capacité de l'organisme humain à les synthétiser ou non. Neuf acides aminés (leucine, isoleucine, valine, thréonine, phénylalanine, tryptophane, lysine, méthionine et histidine) ne peuvent être synthétisés par l'homme. Ils sont appelés « acides aminés essentiels » ou « indispensables ». L'histidine a longtemps été considérée comme un acide aminé non essentiel. En réalité, son pool associé à l'hémoglobine (labile en fonction de la durée de vie des hématies) masque son essentialité. Cette notion d'acide aminé « essentiel » doit cependant être modulée, puisqu'il faut distinguer deux sous-groupes : les acides aminés indispensables dont la synthèse, même partielle, est impossible (lysine et thréonine), et ceux pour lesquels seul le squelette carboné ne peut être synthétisé, la réversibilité des processus de transamination permettant leur synthèse si les acides α-cétoniques correspondants sont fournis. En effet, comme nous l'envisagerons, il existe in vivo une retransamination des acides α-cétoniques à chaîne ramifiée (α-cétoisocaproate, α-cétométhylvalérate, α-cétoisovalérate) en acides aminés à chaîne ramifiée mais elle est quantativement faible (9 % de la leucine métabolisée au niveau du muscle chez l'homme à jeun). Cette possibilité de retransamination in vivo a été exploitée en thérapeutique : l'administration d'α-cétoisocaproate permet, chez l'insuffisant rénal, d'apporter de la leucine tout en prélevant dans l'organisme l'azote mal épuré.*

*De même, le caractère non essentiel des autres acides aminés demande à être précisé. En effet, l'essentialité de ces molécules a été définie à partir des besoins évalués chez l'adulte sain alimenté par voie orale. Or, il existe un certain nombre de situations au cours desquelles un apport exogène devient nécessaire, la synthèse endogène étant insuffisante par rapport aux besoins. C'est le cas de l'arginine chez le jeune enfant en croissance ou chez le patient agressé, de la glutamine chez le malade agressé ou encore de la sérine, de la tyrosine et de l'arginine au cours de l'insuffisance rénale chronique. Ces acides aminés sont ainsi parfois appelés « semi-essentiels » ou « conditionnellement essentiels ».*

*En dehors des synthèses protéiques, les acides aminés sont impliqués dans différentes réactions participant à d'importants processus physiologiques : homéostasie azotée, équilibre acidobasique, métabolisme énergétique, synthèse d'hormones et de médiateurs.*

*En tenant compte de la structure de ces molécules, on peut distinguer trois types de réactions :*

- *celles qui mettent en jeu le groupement aminé. Il s'agit des réactions de transamination, de désamination et d'amination qui toutes contribuent à l'homéostasie azotée : dégradation et/ou synthèse d'acides aminés, élimination de l'azote par l'uréogenèse et l'ammoniogenèse ;*
- *celles qui mettent en jeu le groupement carboxylique : les réactions de décarboxylation conduisant à la formation d'amines ;*
- *enfin, celles qui intéressent la chaîne carbonée de la molécule et qui, en dehors de voies métaboliques propres à chaque acide aminé, participent au métabolisme énergétique (oxydation, néoglucogenèse, cétogenèse).*

# I. Réactions intéressant la fonction amine

## A. Réaction de transamination

Il s'agit d'une réaction générale, tout à fait ubiquitaire. C'est à la fois une réaction de synthèse et de dégradation puisque, par définition, il s'agit du transfert réversible du groupement aminé d'un acide aminé (qui devient un acide α-cétonique) sur un acide α-cétonique conduisant à la synthèse d'un autre acide aminé.

$$R_1-\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH}-COOH + R_2-\underset{\underset{O}{||}}{C}-COOH \rightleftharpoons R_1-\underset{\underset{O}{||}}{C}-COOH + R_2-\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH}-COOH$$

La constante d'équilibre de la réaction étant voisine de 1, celle-ci est totalement réversible, en fonction des concentrations relatives des différentes molécules concernées. Ainsi, la transamination d'un acide aminé donné peut être une réaction de synthèse dans un organe et de dégradation dans un autre. C'est le cas de l'alanine, provenant du pyruvate dans le muscle et redonnant du pyruvate (pour former du glucose) dans le foie.
La plupart des acides aminés peuvent, à un stade quelconque de leur métabolisme, être des donneurs de $NH_2$ dans les processus de transamination. Pour certains, il s'agit d'une réaction majeure (aspartate). Parfois, c'est la seule voie possible permettant d'initier le catabolisme (alanine, acides aminés à chaîne ramifiée). Pour d'autres, la réaction est tout à fait secondaire (histidine, tryptophane).

### 1. Mécanismes de la réaction

Cette réaction est catalysée par des enzymes, les transaminases ou aminotransférases, spécifiques d'un couple acide aminé-acide α-cétonique. Ces enzymes possèdent toutes le même coenzyme : le phosphate de pyridoxal. Au cours de la réaction, le phosphate de pyridoxal est lié sous la forme d'une imine à un radical lysine de l'enzyme. La transamination est une réaction bimoléculaire de type ping-pong :

A-X + enzyme ↔ A-X-enzyme ↔ A + X-enzyme

B + X-enzyme ↔ B-X-enzyme ↔ B-X + enzyme

La réaction se décompose donc en deux étapes : tout d'abord désamination oxydative d'un acide aminé, puis amination réductrice d'un acide α-cétonique. Au cours du cycle catalytique, l'acide aminé se lie au phosphate de pyridoxal pour former transitoirement un intermédiaire qui est une base de Schiff. Cet intermédiaire subit une hydrolyse en acide α-cétonique et phosphate de pyridoxamine. La réaction est rendue possible grâce à la délocalisation des électrons de la liaison de l'hydrogène sur le carbone-α dans le cycle pyridinium. Dans un deuxième temps, un acide α-cétonique se lie au phosphate de pyridoxamine et est hydrolysé en acide aminé et phosphate de pyridoxal (*fig. 1*). Une réaction de transamination est donc définie par le couple acide aminé-acide α-cétonique.

**Figure 1.** Mécanisme de la réaction de transamination

### a) Substrats spécifiques de l'enzyme

- Aspartate aminotransférase : Asp ↔ oxaloacétate
- Alanine aminotransférase : Ala ↔ pyruvate
- Leucine aminotransférase : Leu ↔ α-cétoisocaproate

### b) Substrats non spécifiques de l'enzyme

Le nombre d'acides α-cétoniques accepteurs est limité. On connaît trois systèmes de transamination principaux utilisant pour substrats des acides α-cétoniques communs à plusieurs métabolismes : pyruvate, oxaloacétate et α-cétoglutarate.

Le système de transamination mettant en jeu le couple α-cétoglutarate-glutamate est le plus important car c'est celui qui, en définitive, draine tous les groupements $NH_2$ collectés lors de la transamination des acides aminés, permettant ainsi la redistribution ultérieure de l'azote dans les différents *pools* de l'organisme. Le glutamate généré peut :

- être utilisé dans d'autres réactions de transamination. Ainsi, au niveau musculaire, la transamination de la leucine est couplée à celle du pyruvate, le couple α-céto-glutarate-glutamate étant le couple non spécifique commun aux deux réactions :

Leu αCG Pyr

LAT ALAT

αClC Glu Ala

LAT : leucine aminotransférase
ALAT : alanine aminotransférase

- être utilisé dans les processus de détoxification et d'élimination de l'azote (voir « *Réaction de désamination oxydative* », ci-après, et le chapitre « *Uréogenèse et ammoniogenèse* »).

## 2. Importance physiologique

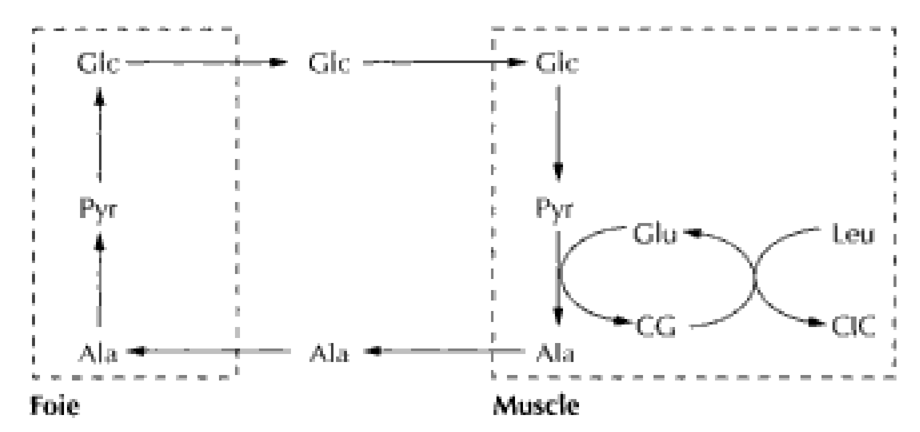
Au niveau du métabolisme intermédiaire, les réactions de transamination ont une place centrale :

- par la libération des squelettes carbonés de divers acides aminés et, notamment, des trois acides α-cétoniques précurseurs de la néoglucogenèse (pyruvate, oxaloacétate et α-cétoglutarate) ;
- par le drainage de l'azote, le glutamate représentant ainsi le carrefour du métabolisme azoté.

L'importance des réactions de transamination dans les processus de redistribution de l'azote peut être illustrée par deux exemples d'échanges interorganes d'acides aminés.

### a) Le cycle alanine-glucose (ou cycle de Cahill)

Ce cycle fait intervenir l'utilisation musculaire du glucose qui est dégradé, en anaérobiose, en pyruvate. Ce dernier peut être transaminé en alanine, elle-même libérée par le muscle. En retour, l'alanine est utilisée dans la néoglucogenèse hépatique après transamination en pyruvate (*fig. 2*).




Ala : alanine ; CG : α-cétoglutarate ; ClC : α-cétoisocaproate ; Glc : glucose ; Glu : glutamate ; Leu : Leucine ; Pyr : pyruvate.

**Figure 2.** Cycle alanine-glucose (ou cycle de Cahill)

### b) Cycles acides aminés à chaîne ramifiée-acides α-cétoniques

Les acides aminés à chaîne ramifiée (AACR : isoleucine, leucine et valine) sont métabolisés en deux temps : une transamination par une aminotransférase, commune aux trois AACR, suivie d'une décarboxylation oxydative par une cétoacide

déshydrogénase. La réaction de transamination est réversible alors que celle de décarboxylation est irréversible. Ainsi, la vitesse de transamination est conditionnée par l'activité de la seconde enzyme (*fig. 3*).

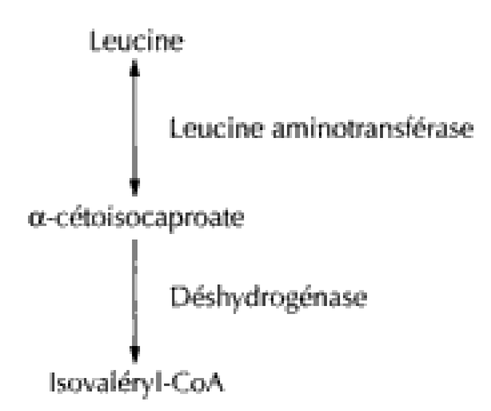



**Figure 3.** L'activité déshydrogénase conditionne la réversibilité de la transaminase

Dans le muscle, l'activité transaminasique est élevée, mais l'activité de la déshydrogénase est faible. Cela a *deux* conséquences :

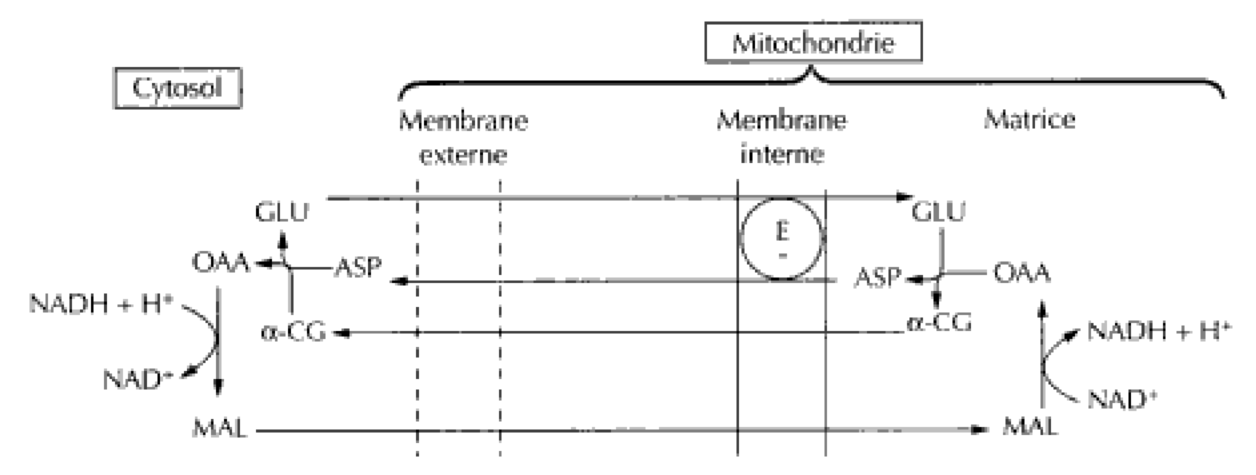
- une quantité non négligeable d'acides α-cétoniques à chaîne ramifiée (ACCR) échappe à la décarboxylation irréversible, passe dans la circulation et rejoint le foie où elle est convertie en corps cétoniques et/ou en glucose utilisés comme substrats énergétiques par les tissus périphériques ;
- la vitesse de transamination est modulée par la vitesse d'élimination du produit de la réaction, donc par l'activité de la déshydrogénase. Celle-ci est régulée selon le même type de processus que la pyruvate déshydrogénase : l'enzyme existe sous une forme phosphorylée (inactive) et une forme non phosphorylée (active). Elle passe de l'une à l'autre forme sous l'influence d'une phosphatase et d'une kinase. Ce sont ces deux dernières enzymes qui sont modulées par divers effecteurs permettant l'épargne des AACR (insuline qui inactive la déshydrogénase) ou leur utilisation (corticoïdes qui l'activent).

Dans le foie, l'activité transaminasique est faible, mais l'activité déshydrogénase est telle que la réaction est finalement plus efficace que la seule activité transaminasique le laisserait prévoir.

### c) Au niveau subcellulaire

Certaines transaminases existent sous des formes isozymiques dont la localisation est différente (par exemple, les aspartates aminotransférases – ASAT – cytosolique et mitochondriale). Ces isoenzymes ont une grande importance sur le plan métabolique, notamment pour le fonctionnement de certaines navettes (*fig. 4*) :

- transfert d'oxaloacétate : l'oxaloacétate ne pouvant traverser la membrane mitochondriale est converti en aspartate par l'ASAT mitochondriale. Dans le cytoplasme, l'aspartate reforme de l'oxaloacétate sous l'action de l'ASAT cytosolique. Ce transfert est nécessaire à la mise en œuvre de la néoglucogenèse ;
- navette malate-oxaloacétate : elle met en jeu le couplage des isoenzymes de l'ASAT et de la malate déshydrogénase permettant, *via* la navette oxaloacétate, le transfert d'équivalents réducteurs ($NADH,H^+$).




ASP : aspartate ; α-CG : α-cétoglutarate ; GLU : glutamate ; MAL : malate ; OAA : oxaloacétate.

**Figure 4.** Navettes intracellulaires impliquant le glutamate et l'aspartate

## B. Synthèse et dégradation des amides d'acides aminés

Ces réactions concernent la glutamine et l'asparagine. La glutamine est quantitativement l'acide aminé le plus important dans le plasma (500 à 750 µmol/L) et dans le muscle (20 mmol/L d'eau cellulaire, soit 60 % du total des acides aminés libres, taurine exclue). Les réactions sont irréversibles, une enzyme permettant la synthèse (ex. : glutamine synthétase), une autre le catabolisme (ex. : glutaminase) :

$$\underset{\text{Glutamine}}{COOH{-}CH(NH_2){-}CH_2{-}CH_2{-}CO{-}NH_2} + H_2O \xrightarrow[\text{Glutaminase}]{NH_3} \underset{\text{Glutamate}}{COOH{-}CH(NH_2){-}CH_2{-}CH_2{-}COOH}$$

$$\text{Glutamine} \xleftarrow[\text{Synthétase}]{NH_3} \text{Glutamate}$$

La *glutamine synthétase* est une enzyme cytosolique. La réaction consomme de l'énergie (1 mole d'ATP par mole de glutamine formée, avec libération de 1 mole d'ADP + Pi). Elle nécessite la présence d'un cation divalent ($Mg^{2+}$, $Mn^{2+}$, $Co^{2+}$).

La *glutaminase* est liée à la face interne de la membrane interne de la mitochondrie. Il existe plusieurs isoenzymes (masse moléculaire : 120 000 à 150 000 Da), phosphate-dépendantes ou indépendantes.

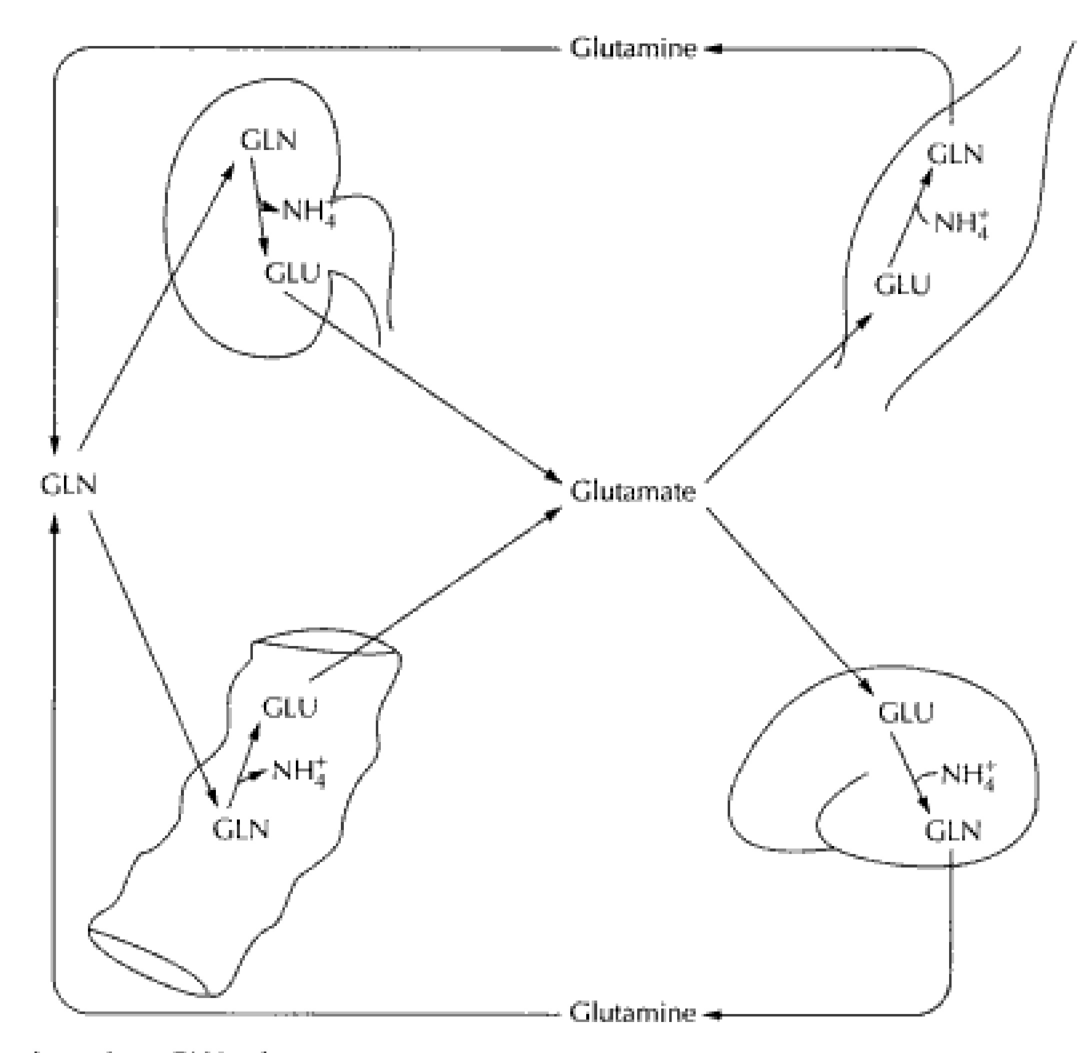
Les amides d'acides aminés jouent un rôle de *premier plan* dans le transport de l'azote.

Dans un tissu donné, excepté dans le foie, il n'existe, en quantité appréciable, que l'une ou l'autre enzyme (*fig.* 5) :

- glutamine synthétase dans le muscle et le poumon, qui sont des organes producteurs de glutamine ;
- glutaminase dans l'intestin et le rein, qui sont consommateurs de glutamine.

Le foie possède les deux enzymes mais dans des sous-populations différentes d'hépatocytes (*fig. 6*) :

- les hépatocytes périportaux possèdent la glutaminase et dégradent la glutamine dont la fonction amide alimente l'uréogenèse ;
- les hépatocytes périveineux possèdent la glutamine synthétase qui conduit à la formation de glutamine exportée dans le sang périphérique.




GLN : glutamine ; GLU : glutamate.

**Figure 5.** Échanges interorganes de la glutamine et du glutamate

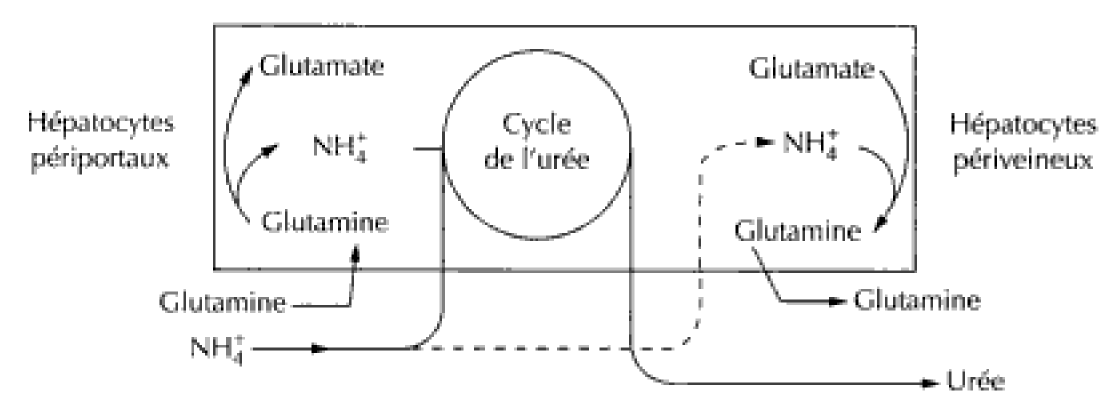



**Figure 6.** Compartimentalisation hépatique du métabolisme de la glutamine

Ainsi, selon la situation métabolique, le foie est soit consommateur (après un repas), soit producteur (en phase interprandiale) de glutamine. Il joue donc, grâce à ces *deux* enzymes, un rôle fondamental dans l'homéostasie de la glutamine.
Dans le rein, la présence de la glutaminase permet la libération de l'ammoniaque nécessaire à l'ammoniogenèse rénale et donc à l'élimination urinaire des ions $H^+$ (voir « *Uréogenèse et ammoniogenèse* »).
La glutamine est un substrat énergétique de premier choix. Son oxydation complète, au niveau de l'entérocyte par exemple, produit 30 moles d'ATP/mole de glutamine. Il en est de même dans toutes les cellules à vitesse de renouvellement rapide (leucocytes, fibroblaste, cellules tumorales).
Enfin, la glutamine intervient comme donneur d'azote pour la synthèse des bases puriques et pyrimidiques.

## C. Réaction de désamination oxydative

Cette réaction transforme un acide aminé en acide α-cétonique. Contrairement à la réaction de transamination, il n'y a pas d'accepteur de l'azote : celui-ci est libéré sous forme d'ammoniaque.
Il s'agit d'une réaction en *deux* étapes : la première livre un intermédiaire iminé (déshydrogénation enzymatique), la seconde est une hydrolyse spontanée. Il existe plusieurs enzymes de ce type. Seule la L-glutamate déshydrogénase a, chez l'homme, une importance fondamentale.

### 1. L-glutamate déshydrogénase (EC 1.4.1.3)

Cette enzyme utilise le $NAD^+$ comme coenzyme. Sa masse moléculaire est voisine de 350 000 Da. Elle possède six sous-unités identiques et est soumise à une régulation allostérique positive (ADP, GDP) et négative (ATP, GTP, $NADH+H^+$). Son rôle est double :

- elle permet l'*oxydation du glutamate* (issue par exemple de la glutamine par l'action de la glutaminase) dans le cycle de Krebs. Cette réaction de désamination oxydative est donc fondamentale dans les cellules utilisant la glutamine comme substrat énergétique préférentiel : entérocyte, leucocytes, fibroblaste, cellules cancéreuses ;
- elle permet la *libération de molécules d'ammoniaque* – pour leur excrétion telles quelles – au niveau du rein (rôle dans l'équilibre acidobasique).

$$HOOC{-}CH_2{-}CH_2{-}CH(NH_2){-}COOH \xrightarrow{NAD^+ \;\to\; NADH+H^+} HOOC{-}CH_2{-}CH_2{-}C({=}NH){-}COOH \xrightarrow[+H_2O]{\to NH_3} HOOC{-}CH_2{-}CH_2{-}C({=}O){-}COOH$$

Acide L-glutamique — Acide α-imino glutarique — Acide α-céto glutarique

*Remarque* : dans certaines cellules, comme les hépatocytes périveineux (*fig.6*), la réaction fonctionne en sens inverse, fournissant du glutamate pour la néosynthèse de glutamine.

## 2. Autres enzymes

- La *D-aminoacide oxydase* est très répandue, notamment dans le foie et le rein. Le coenzyme de la réaction est la flavine adénine dinucléotide (FAD). Les D-aminoacides ne sont pas physiologiques mais peuvent néanmoins être produits par la flore intestinale. L'enzyme permettrait donc leur dégradation.
- La *L-aminoacide oxydase*, avec la flavine mononucléotide (FMN) comme coenzyme, dont l'importance métabolique est minime et concerne surtout la lysine. La régénération des coenzymes des D- et L-oxydases implique la formation d'$H_2O_2$ éliminé par l'intervention d'une catalase :

$$RH-CH(NH_2)(COOH) \xrightarrow{\text{Oxydase}} R-C(=NH)(COOH)$$

Flavine → Flavine $H_2$ ; Flavine $H_2$ + $O_2$ → Flavine + $H_2O_2$

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} H_2O + 1/2\,O_2$$

- La *glycine déshydrogénase* (ou glycine oxydase). Cet enzyme, à $NAD^+$, catalyse la désamination oxydative de la glycine en glyoxylate et ammoniaque. Sa contribution au flux corporel total de la glycine est minime (0,2 à 0,4 %).

*Remarque* : il s'agit d'une désamination non oxydative. Cette réaction concerne les acides aminés possédant une fonction alcool (déshydratase), une fonction soufrée (désulfhydrase) et l'histidine. Elle livre une molécule d'ammoniaque.

La synthèse du monoxyde d'azote (NO) à partir de l'arginine ne s'inscrit pas dans ce schéma commun des réactions de désamination oxydative. Les NO synthases catalysent une double réaction de mono-oxygénation :

$$\text{L-arginine} \xrightarrow[NADPH_2 + O_2]{} \text{N-hydroxy-L-arginine} \xrightarrow[NADPH_2 + O_2]{} \text{Citrulline + NO}$$

Cette réaction concerne l'un des groupements aminés guanidiniques de l'arginine et non le groupement $\alpha$-aminé.

# D. Destinée finale du groupement aminé

Il s'agit de l'uréogenèse et de l'ammoniogenèse (voir « *Uréogenèse et ammoniogenèse* »). Retenons simplement ici que l'azote est éliminé essentiellement sous forme d'urée, molécule non toxique pour l'organisme.
L'azote provient essentiellement de la glutamine désaminée en glutamate. L'ion libéré participe à la synthèse de carbamoyl-phosphate tandis que le glutamate est le précurseur du N-acétylglutamate, activateur allostérique de la carbamoyl-phosphate synthétase.

Autrement dit, une augmentation du *turn-over* protéique augmente la synthèse et la libération de glutamine par les tissus périphériques et sa captation par les territoires splanchniques : l'afflux de glutamine dans le foie active la glutaminase, la formation d'ammoniaque, de glutamate et de N-acétylglutamate (*fig.* 7).
L'arginine joue également un rôle important dans l'activation de l'uréogenèse.

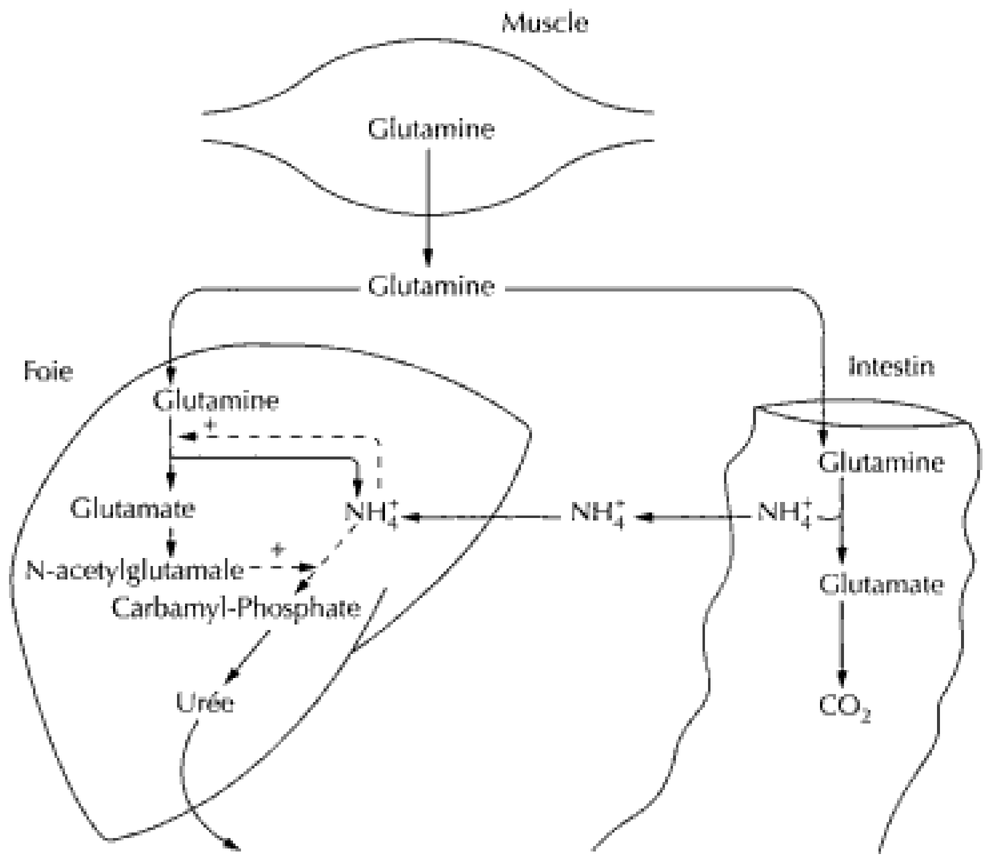



**Figure 7.** Contribution interorgane de la glutamine à l'uréogenèse

## II. Réactions de décarboxylation

Il s'agit d'une réaction irréversible de dégradation des acides aminés se traduisant par la perte de la fonction carboxylique.

$$R-CH\begin{matrix}COOH\\NH_2\end{matrix} \longrightarrow R-CH_2-NH_2 + CO_2$$

Ces réactions sont spécifiques des L-acides aminés. Les décarboxylases ont pour coenzyme le phosphate de pyridoxal.
Dans les tissus animaux, la décarboxylation est un processus secondaire sur le plan quantitatif. Il n'en est pas de même sur le plan qualitatif, ainsi qu'en témoigne l'importance biologique des amines formées. Le *tableau* ci-dessous indique les acides aminés concernés par cette réaction, le produit de la réaction, la localisation tissulaire de l'enzyme et le rôle biologique principal de l'amine formée.

Les décarboxylases sont des enzymes dont l'activité est finement régulée. À titre d'exemple, l'ornithine décarboxylase (ODC ; MM = 51 000 Da, pI = 5,1) voit sa synthèse diminuer très rapidement et son catabolisme augmenter lorsque la concentration cellulaire en putrescine augmente. L'inverse est observé lorsque les cellules sont stimulées par des hormones anaboliques (androgènes). Il existe de plus une régulation assurée par une protéine inhibitrice de MM 22 000 Da, appelée « antizyme », qui faciliterait la dégradation de l'enzyme.

| | Produit de décarboxylation | Localisation tissulaire | Rôle biologique de l'amine |
|---|---|---|---|
| Ornithine | Putrescine | Intestin, foie, rein | Synthèse protéique, multiplication cellulaire, activation des lymphocytes |
| Histidine | Histamine | Rein, foie, intestin<br>Intestin, foie, rein | Action sur la pression artérielle |
| Tyrosine | Tyramine | Rein | Contraction de l'utérus |
| Glutamate | γ-aminobutyrate | Cerveau | Fonctionnement des cellules nerveuses |
| diOHphénylalanine | diOHphényl éthylamine | Foie, pancréas, intestin, rein | Précurseur de l'adrénaline |
| Cystéine | Taurine | Foie, rate, cerveau | Conjugaison des acides biliaires |

## III. Métabolisme du squelette carboné

À chaque acide aminé correspond une voie catabolique particulière, mais ces voies convergent toutes vers un nombre limité de produits : soit l'acétoacétate, soit un substrat du cycle tricarboxylique (acétyl-CoA, α-cétoglutarate, succinyl-CoA, fumarate, oxaloacétate). On peut donc distinguer :
- des acides aminés cétogènes (isoleucine, leucine, lysine, tryptophane, tyrosine et phénylalanine) dont le catabolisme produit de l'acétoacétate ;
- des acides aminés glucoformateurs qui peuvent être soit totalement oxydés en $CO_2$ dans le cycle de Krebs, soit être utilisés dans la néoglucogenèse *via* l'oxaloacétate (*fig. 8*).

Cette notion d'acides aminés cétogènes ou glucoformateurs n'est pas absolue puisque trois acides aminés (isoleucine, tyrosine et phénylalanine) sont à la fois cétogènes et glucoformateurs :
- la tyrosine et la phénylalanine sont dégradées en fumarate et en acétoacétate ;
- l'isoleucine est dégradée en acétyl-CoA et en acétoacétate.

Enfin, cette distinction doit être relativisée dans la mesure où il ne s'agit que d'une possibilité d'évolution finale de la molécule et non d'une destinée obligatoire.
Ainsi, la contribution des acides aminés à la néoglucogenèse est très variable. Elle est importante pour l'alanine, la glutamine, la glycine et la proline, beaucoup plus faible pour les autres acides aminés glucoformateurs.

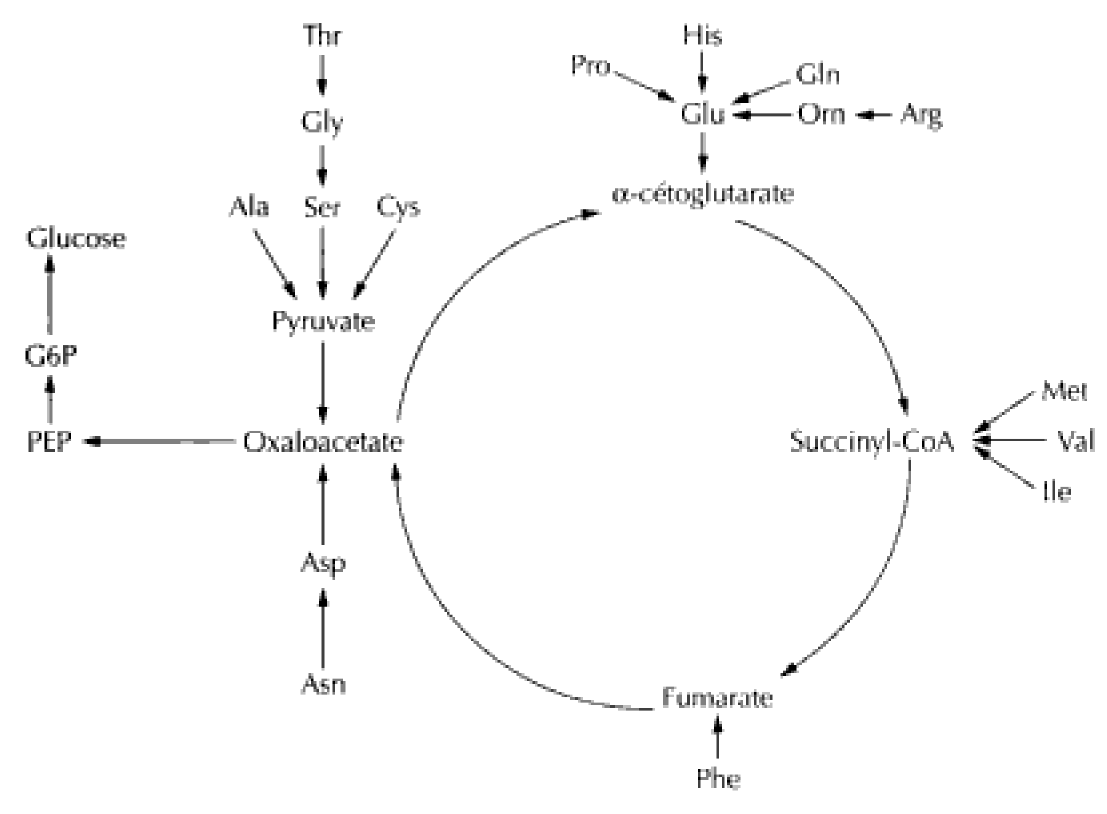



**Figure 8.** Entrée des acides aminés dans le cycle de Krebs et la néoglucogenèse

# IV. Régulation des processus généraux de synthèse et de dégradation des acides aminés

La régulation de la synthèse et de la dégradation des acides aminés est sous la dépendance de *deux* facteurs intriqués.

## A. Contrôle par la disponibilité en substrats

Les réactions précédentes pourront évoluer différemment selon que l'individu est à jeun ou non. Après un repas protéique, les acides aminés qui auront échappé au métabolisme dans l'aire splanchnique viendront enrichir le sang périphérique : dans les conditions normales, le foie capte environ 50 % des acides aminés absorbés, un tiers étant destiné à la synthèse protéique tandis que le reste est dégradé avec production d'urée. Du fait de l'activité réduite de l'AACR transaminase au niveau splanchnique, les AACR ont un métabolisme hépatique limité, d'où une relative abondance dans le sang périphérique. Au contraire, les concentrations de glutamate, glutamine et aspartate varient peu en dépit de leur présence importante dans les protéines du fait d'un catabolisme viscéral important (voir *supra*). L'afflux des AACR (en particulier la leucine) au niveau périphérique favorise les synthèses protéiques tandis que l'augmentation du flux portal d'ammoniaque stimule la glutaminase hépatocytaire et augmente le flux d'urée.
En situation de jeûne, la dépendance de la fourniture de glucose vis-à-vis de la néoglucogenèse s'accroît progressivement. Elle nécessite le transfert d'acides aminés

néoglucogéniques, notamment d'alanine, vers le foie : il existe ainsi une activation du cycle alanine-glucose, mentionné précédemment, au détriment des AACR musculaires, ce qui s'accompagne d'une libération accrue d'acides α-cétoniques utilisables dans la cétogenèse hépatique.

## B. Contrôle hormonal

Il s'exerce soit directement en agissant sur les différentes voies métaboliques, soit indirectement par le contrôle de la disponibilité en substrats.

### 1. Hormones anaboliques

L'insuline et l'hormone de croissance favorisent l'utilisation des acides aminés dans les synthèses protéiques musculaires. Il faut souligner que la secrétion de ces hormones est stimulée par certains acides aminés, en particulier la leucine et l'arginine.
L'insuline augmente le transfert cellulaire des acides aminés. Elle favorise l'épargne des acides aminés en exerçant un effet inhibiteur direct sur la néoglucogenèse. Elle inhibe également les cétoacides déshydrogénases musculaires, d'où une économie des AACR pour la synthèse protéique.

### 2. Hormones cataboliques

En situation de stress, les hormones cataboliques, et plus particulièrement le cortisol (sans doute conjointement avec les cytokines comme le TNFα et l'IL1β), stimulent la libération périphérique des acides aminés par activation de la protéolyse. L'activation de l'ACCR déshydrogénase favorise la synthèse musculaire d'alanine (cycle de Cahill). En parallèle, le glucagon et, dans une moindre mesure, le cortisol stimulent la captation hépatique des acides aminés et leur utilisation dans la néoglucogenèse avec élimination du groupement aminé dans l'uréogenèse.

# Conclusion

Les processus généraux de catabolisme des acides aminés sont en nombre limité. Outre la réaction de transamination qui permet de redistribuer l'azote corporel, les réactions d'amination et de désamination contrôlent la réutilisation et l'élimination de l'azote excédentaire. Les réactions de décarboxylation des acides aminés sont irréversibles et conduisent à la formation d'amines aux propriétés particulières. Les réactions de décarboxylation des acides α-cétoniques sont les étapes limitantes du métabolisme de certains acides aminés, notamment ceux à chaîne ramifiée, et contrôlent la vitesse de transamination.

*Pour en savoir plus*


- Cynober L., Coudray-Lucas C., Ziegler F., De Bandt J.-P. *et al.* Métabolisme azoté chez le sujet sain. *Nutr Clin Métabol*, 1989 : 3 ; 87-101.

- Cynober L., Marcollet M. Métabolisme des protéines. Encycl Med Chir (Elsevier, Paris), 1994 : 10-375-A-10.
- Cynober L. « Amino acid metabolism » in *Encyclopedia of biological chemistry* (Elsevier Inc., New York, États-Unis) 2004 ; 1 : 90-5.
- Harper A.E., Miller R.H., Block X.P. Branchedchain aminoacid metabolism. *Ann Rev Nutr*, 1984 : 4 ; 409-54.
- Haussinger D., Sies H. *Glutamine metabolism in mammalian tissues*. Berlin (Allemagne), Springer, 1984.
- Moinard C. Cynober L., De Bandt J.-P. Polyamines : metabolism and implications in human diseases. *Clin Nutr, 2005 : 24 : 184-97.*

# Uréogenèse et ammoniogenèse

L. CYNOBER[1], J.-P. DE BANDT
Laboratoire de biochimie, Hôtel-Dieu, AP-HP, Paris.
Laboratoire de biologie de la nutrition, EA 2498, UFR de pharmacie, Paris-V.



1. Pour toute question relative à ce chapitre : luc.cynober@htd.aphp.fr.

*Les protéines constituent chez l'adulte sain un pool en équilibre dynamique, c'est-à-dire que, sur une période de 24 heures, les synthèses équilibrent le catabolisme. L'oxydation complète des acides aminés issus des protéines conduit à la production quasi isomolaire des ions $NH_4^+$ et $HCO_3^-$. Les remaniements protéiques, l'utilisation énergétique des acides aminés, leur afflux après un repas posent le problème de l'élimination des ions $NH_4^+$ et $HCO_3^-$ excédentaires dont l'équivalent de 1 mole est formé chaque jour dans l'organisme. L'élimination de l'ammoniac ne peut s'effectuer directement car, à une concentration circulante supérieure à 50 µmol/L, cette molécule est toxique pour le système nerveux central. Chez l'homme, la voie de détoxification de l'azote est l'uréogenèse, ou synthèse d'urée. Il s'agit d'une molécule atoxique synthétisée par le foie et éliminée dans les urines.*
*Toutefois, l'ammoniac ne doit pas être converti en totalité en urée car il joue un rôle fondamental dans l'équilibre acidobasique au niveau du rein.*
*Par ailleurs, le couple $HCO_3^-/CO_2$ représente le système tampon le plus important pour le maintien de l'équilibre acidobasique. Or, la synthèse d'urée correspond à la consommation isomolaire des ions $NH_4^+$ et $HCO_3^-$ :*

$$2NH_4^+ + 2HCO_3^- \rightarrow \text{urée} + CO_2 + 3H_2O$$

*Il est donc nécessaire que la régulation de l'uréogenèse permette l'économie de $HCO_3^-$ en cas d'acidose. Afin de se protéger de l'ammoniac et en même temps de pouvoir limiter une uréogenèse excessive, l'organisme dispose d'un acide aminé, la glutamine, qui joue le rôle de transporteur interorganes d'ammoniac. Le métabolisme rénal de la glutamine tient une part prépondérante dans l'ammoniogenèse dont la vitesse est réglée par le fonctionnement d'une enzyme, la glutaminase.*

# I. Uréogenèse

Le cycle de l'uréogenèse est exclusivement localisé dans le foie, seul organe possédant toutes les enzymes de ce métabolisme en quantité notable. Cette voie métabolique peut être divisée en deux parties :

- l'acheminement de l'azote excédentaire jusqu'au foie : il est assuré principalement par la glutamine et l'alanine. Certains aspects de ces voies métaboliques, et en particulier la coopération intestin-foie en période postprandiale, sont développés ci-dessous. Pour plus de détails, nous renvoyons le lecteur au chapitre « *Réactions générales du catabolisme des acides aminés* » ;
- la synthèse de l'urée proprement dite, ou cycle de l'urée, découverte en 1932 par Hans Krebs et Kurt Henseleit.

Il faut noter que toute cellule (e.g. macrophage, cellule endothéliale, etc.) possédant une activité arginase peut produire de l'urée, mais ce phénomène est quantitativement peu important.

## A. Étapes du cycle de l'urée

Le cycle de l'urée est formé de cinq réactions, dont quatre forment le cycle proprement dit, aboutissant à la régénération de l'ornithine et à la libération d'une molécule d'urée (*fig. 1*). Le cycle est en partie mitochondrial, en partie cytoplasmique.

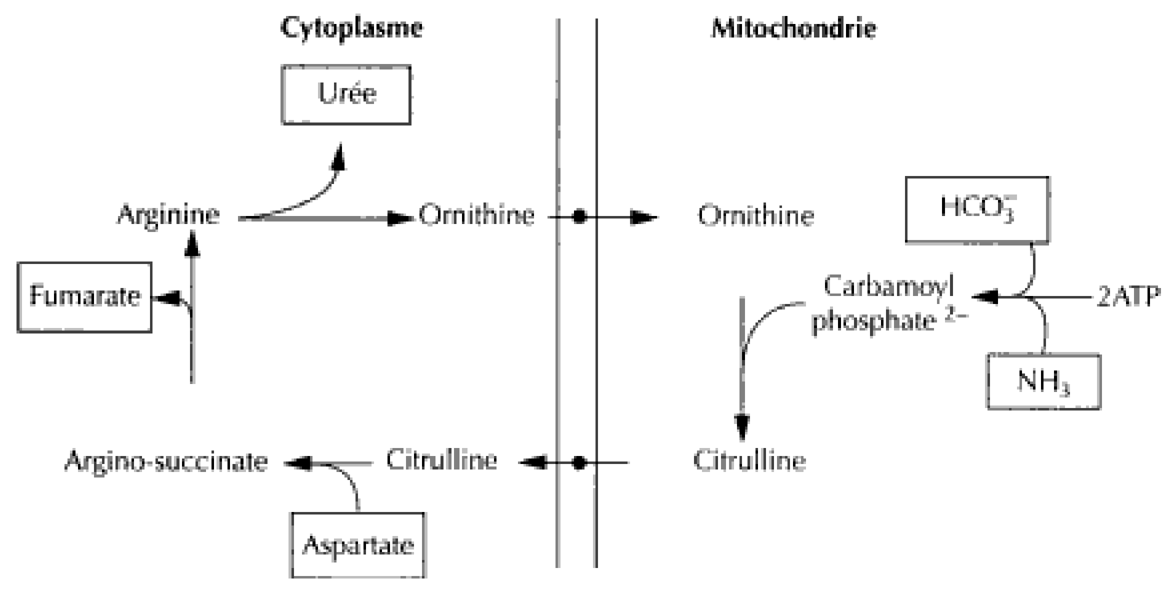



**Figure 1.** Schéma général du cycle de l'urée
Le détail des réactions et les éléments de régulation sont présentés dans les figures suivantes.

## 1. Carbamoyl-phosphate synthétase (CPS-I)

Cette réaction mitochondriale permet la synthèse du carbamoylphosphate à partir de l'ammoniac et du bicarbonate :

$$2\ ATP + NH_3 + HCO_3^- + carbamoylphosphate^{2-} + 2\ ADP + Pi + H^+$$

Elle utilise $NH_3$ plutôt que $NH_4^+$ comme substrat. $HCO_3^-$ est formé à partir du $CO_2$ généré dans le cycle tricarboxylique de Krebs. La formation de $HCO_3^-$ implique une anhydrase carbonique et, pour une faible part, des réactions d'hydratation non catalytiques.

La CPS-I est formée de deux sous-unités de MM 160 000 Da. Elle est localisée au niveau de la membrane interne de la mitochondrie à laquelle elle est associée de manière lâche. Le N-acétylglutamate (voir plus loin la synthèse de cette molécule) est un activateur allostérique obligatoire de la CPS-I. La liaison d'une molécule de N-acétylglutamate à une sous-unité de l'enzyme nécessite la présence d'ATP et de $Mg^{2+}$. Parmi les produits de la réaction, seul l'ADP est fortement inhibiteur. Les propriétés particulières de cette enzyme en font un élément clé de la régulation du cycle de l'urée.

## 2. Ornithine carbamoyltransférase (OCT)

L'OCT catalyse la formation mitochondriale de citrulline :

$$H_2N{-}CH(COOH){-}(CH_2)_3{-}NH_2 + H_2N{-}CO{-}O{-}P \longrightarrow H_2N{-}CH(COOH){-}(CH_2)_3{-}NH{-}C(=O){-}NH_2 + Pi$$

Ornithine — Carbamoylphosphate — Citrulline

L'OCT est composée de trois sous-unités identiques de MM 36 500 Da chez l'homme. Bien que cette réaction soit réversible, l'équilibre de la réaction favorise largement la formation de citrulline. L'OCT est associée au transporteur ornithine-citrulline au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Le carbamoyl-phosphate est donc canalisé depuis sa formation jusqu'à son utilisation au sein de ce qui pourrait être considéré comme un complexe multienzymatique formé de la CPS, de l'OCT et du transporteur citrulline-ornithine (*fig.* 2).
Ce modèle peut être vu comme un système d'épargne de métabolites intermédiaires. Son efficacité permet d'expliquer :

- la concentration intramitochondriale extrêmement faible en carbamoylphosphate libre ;
- l'origine exclusivement cytoplasmique de l'ornithine utilisée pour la synthèse de citrulline.

*Remarque* : l'OCT peut également utiliser la lysine [$NH_2 - (CH_2)_4 - CHCOOHNH_2$] comme substrat. Le produit de la réaction est alors l'homocitrulline. À l'état physiologique, cette réaction est quantitativement négligeable (< 0,2 % de celle impliquant l'ornithine).

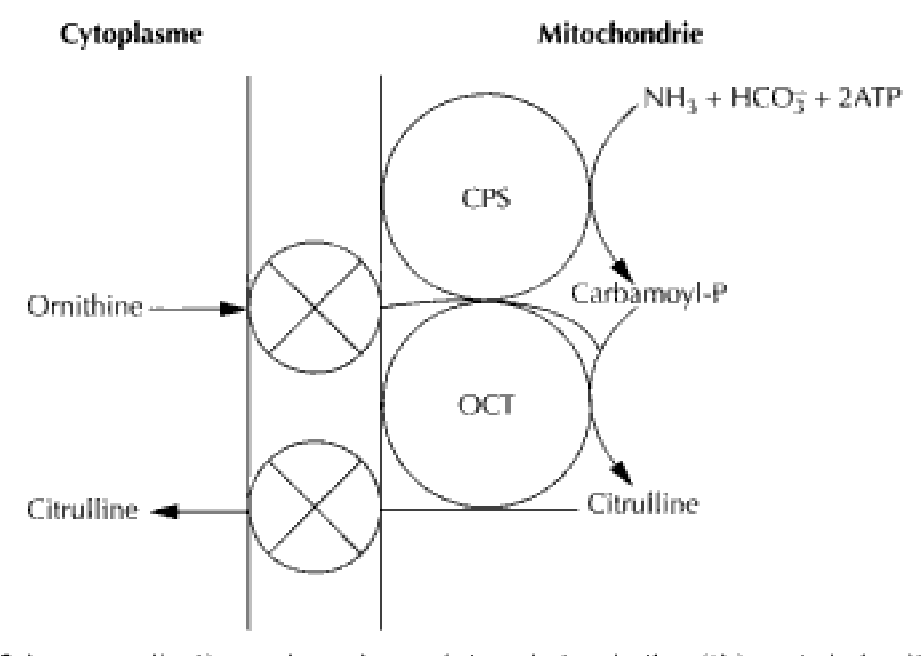



**Figure 2.** La « canalisation » du carbamoylphosphate, de l'ornithine et de la citrulline à la face interne de la membrane mitochondriale

## 3. Arginosuccinate synthétase

Cette enzyme, comme les suivantes, est de localisation cytoplasmique. Elle catalyse la condensation de la citrulline et de l'aspartate.
La réaction, réversible, est déplacée vers la formation d'arginosuccinate du fait de la consommation, par une pyrophosphatase, du pyrophosphate produit.
L'enzyme est un homotétramère (MM des sous-unités = 46 000 Da).

Citrulline + Pi + Acide aspartique + ATP ⟶ Acide arginosuccinique + AMP + PPi

Citrulline: $O=C(NH_2)-NH-(CH_2)_3-CH(H_2N)(COOH)$

Acide aspartique: $COOH-CH(NH_2)-CH_2-COOH$

Acide arginosuccinique: $COOH-CH(CH_2-COOH)-N=C(NH_2)-NH-(CH_2)_3-CH(NH_2)-COOH$

## 4. Arginosuccinate lyase

Cette enzyme catalyse le clivage de l'arginosuccinate en arginine et en fumarate.

Acide arginosuccinique ⟶ Arginine + Acide fumarique

Acide arginosuccinique: $COOH-CH(CH_2-COOH)-N=C(NH_2)-NH-(CH_2)_3-CH(H_2N)(COOH)$

Arginine: $HN=C(NH_2)-NH-(CH_2)_3-CH(H_2N)(COOH)$

Acide fumarique: $COOH-CH=CH-COOH$

L'enzyme est également un homotétramère (MM des sous-unités = 50 000 Da).

## 5. Arginase

La réaction, fortement exergonique ($\Delta$ G0 = – 12,3 kcal/mol) libère une molécule d'urée et régénère l'ornithine.

arginine ⟶ $O=C(NH_2)_2$ + ornithine

Urée

L'arginase a une MM de 107 000 à 118 000 Da selon les espèces et serait un trimère ou un tétramère.

Des enzymes du cycle de l'urée, l'arginase est celle dont la Vmax est la plus élevée : 6,5 fois celle de l'OCT, plus de 350 fois celle des autres enzymes. L'arginase n'est donc jamais l'étape limitante du flux uréogénique. Il existe deux isoenzymes : de type I dans l'hépatocyte, de type II dans les autres cellules. Comme nous l'avons vu plus

haut, seul le foie possède l'ensemble des enzymes nécessaires à l'uréogenèse. Cependant, d'autres tissus possèdent une ou plusieurs enzymes. Par exemple, l'intestin exprime l'arginase, la CPS et l'OCT et le rein les arginosuccinates synthétase et lyase. Ainsi, une partie de l'arginine captée par l'intestin est libérée dans le sang portal sous forme de citrulline, laquelle est métabolisée dans le rein libérant l'arginine. Ces échanges interorganes permettent d'éviter une uréogenèse excessive après un repas (voir plus loin) car la citrulline, contrairement à l'arginine, n'est pas captée par le foie.

## B. Bilan de l'uréogenèse

Tous les substrats intermédiaires étant régénérés, seule la consommation d'énergie est à prendre en compte : soit quatre liaisons riches en énergie (2 ATP → 2 ADP pour la synthèse de carbamoylphosphate, 1 ATP → 1 AMP pour la synthèse d'arginosuccinate). L'uréogenèse a donc un coût énergétique.

## C. Régulation de l'uréogenèse

La synthèse de l'urée est soumise à trois types de régulation : le flux de substrats en amont du cycle de l'urée, une régulation allostérique des enzymes du cycle et une régulation hormonale qui concerne aussi bien le flux des précurseurs que les enzymes du cycle.

### 1. Régulation par les substrats

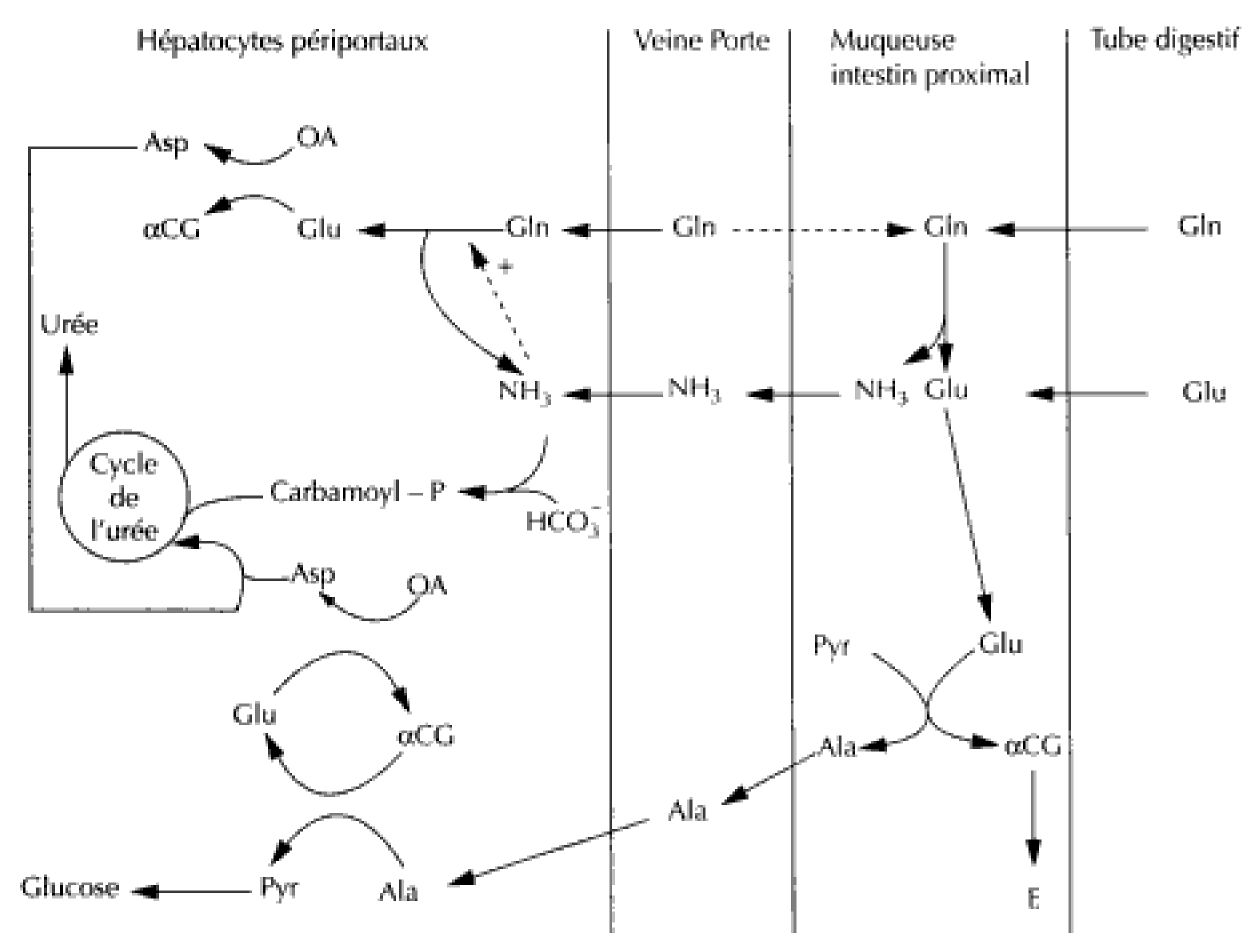
Dans la plupart des cas, le catabolisme oxydatif des acides aminés dans les tissus périphériques aboutit à la perte du (des) groupement(s) azoté(s) retrouvé(s) dans la circulation, soit libre(s) sous forme de $NH_3$, soit, pour la plus grande part, sous forme de glutamine et d'alanine qui assurent les échanges interorganes d'azote (voir « *Réactions générales du catabolisme des acides aminés* »).
Le flux d'azote est assuré différemment selon la situation physiologique.

#### a) Période postprandiale

Après un repas, plus de 50 % de l'azote absorbé sont immédiatement transformés en urée. Le flux uréogénique est, dans ce cas, lié au fonctionnement couplé de l'intestin et du foie (*fig.* 3). La finalité de ce processus est essentiellement d'éviter qu'un excès d'acides aminés parvienne dans la circulation générale, ce qui pourrait avoir des effets délétères au niveau cérébral (de nombreux acides aminés sont des neuromédiateurs ou précurseurs de neuromédiateurs).

■ ***Au niveau intestinal***

Les acides aminés libres, issus des protéines alimentaires sous l'action des protéases intestinales et des peptidases entérocytaires, parviennent dans la circulation portale. Toutefois, la glutamine et le glutamate, qui représentent environ 20 % du contenu protéique en acides aminés, sont largement oxydés dans l'entérocyte. Cela conduit en particulier à une économie de la glutamine apportée par la circulation splanchnique (la captation luminale de la glutamine dans l'entérocyte déprime en effet son utilisation au pôle portal de la cellule). Il en résulte un flux important d'acides aminés (principalement d'alanine) et d'ammoniac vers le foie.




Gln, glutamine ; Glu, glutamate ; Pyr, pyruvate ; Ala, alanine ; Asp, aspartate ;
αCG, α-cétoglutarate ; OA, oxaloacétate ; E : énergie.

**Figure 3.** Coopération entre l'intestin et le foie en période postprandiale

### ■ *Au niveau hépatique*

La glutamine est hydrolysée en glutamate et en ammoniac par une glutaminase mitochondriale présente en très grande quantité dans les hépatocytes périportaux. L'activité glutaminasique est alors très élevée car cette enzyme possède la propriété d'être activée par le produit de la réaction, l'ammoniac (*fig.* 3). Or, le flux portal d'ammoniac est lui-même très augmenté (glutaminolyse intestinale + production d'ammoniac par les bactéries du tube digestif). L'ammoniac, quelle que soit sa source (portale ou hépatocytaire), est incorporé dans le carbamoylphosphate.

L'alanine est transaminée en pyruvate, largement utilisé pour la synthèse de glucose et sa mise en réserve sous forme de glycogène, son groupement aminé permettant la formation de glutamate à partir de l'α-cétoglutarate.

Le glutamate, issu des réactions précédentes, peut, sous l'action de l'aspartate aminotransférase, céder son groupement $-NH_2$ à l'oxaloacétate pour former de l'aspartate. Ce dernier, après transfert de la mitochondrie dans le cytoplasme, apporte le deuxième groupement azoté nécessaire à la synthèse de l'urée. L'augmentation du flux de glutamate favorise également la synthèse de N-acétylglutamate dont l'importance est précisée plus loin.

Tous les autres acides aminés pouvant être transaminés ou subir une désamination participent également à des degrés divers à l'uréogenèse.

### b) Période interprandiale

Le flux azoté en provenance de l'intestin est très atténué en période interprandiale. L'azote (aux deux tiers sous forme d'alanine et de glutamine) provient du muscle. L'alanine est le substrat privilégié de l'uréogenèse tandis que la glutamine est captée préférentiellement par l'intestin. Le flux uréogénique est nettement plus faible qu'en période postprandiale.

### c) En situation pathologique

Lors d'un stress, l'efflux musculaire de l'azote est considérablement augmenté, notamment en réponse à l'hypercorticisme. L'uréogenèse s'accroît en conséquence tandis que le squelette carboné des acides aminés est utilisée dans la néoglucogenèse.
Au contraire, lors d'un jeûne, le processus d'épargne protéique tarit le flux uréogénique. Ces exemples illustrent bien le rapport étroit qui existe entre la vitesse de formation de l'urée et la disponibilité en substrats.

## 2. Régulation allostérique : rôle du N-acétylglutamate

Le N-acétylglutamate est le régulateur allostérique obligatoire de la CPS-I (voir plus haut). La synthèse de N-acétylglutamate est catalysée par le N-acétylglutamate synthétase :

$$\text{acétylCoA} + \text{glutamate} \rightarrow \text{N-acétylglutamate} - \text{CoASH}$$

Cette enzyme mitochondriale est un trimère de MM 160 000 Da. Elle est puissamment activée par l'arginine. Deux remarques s'imposent :

- la genèse d'arginine dans le cycle de l'urée est cytoplasmique. Le rôle activateur de cet acide aminé sur le N-acétylglutamate synthétase implique son transport préalable dans la mitochondrie ;
- le couple N-acétylglutamate-arginine constitue un système d'activation extrêmement efficace du cycle de l'urée puisqu'il intervient simultanément en début (le N-acétylglutamate sur la CPS-I) et en fin de cycle (l'arginine sur le N-acétylglutamate synthétase) (*fig. 4*).

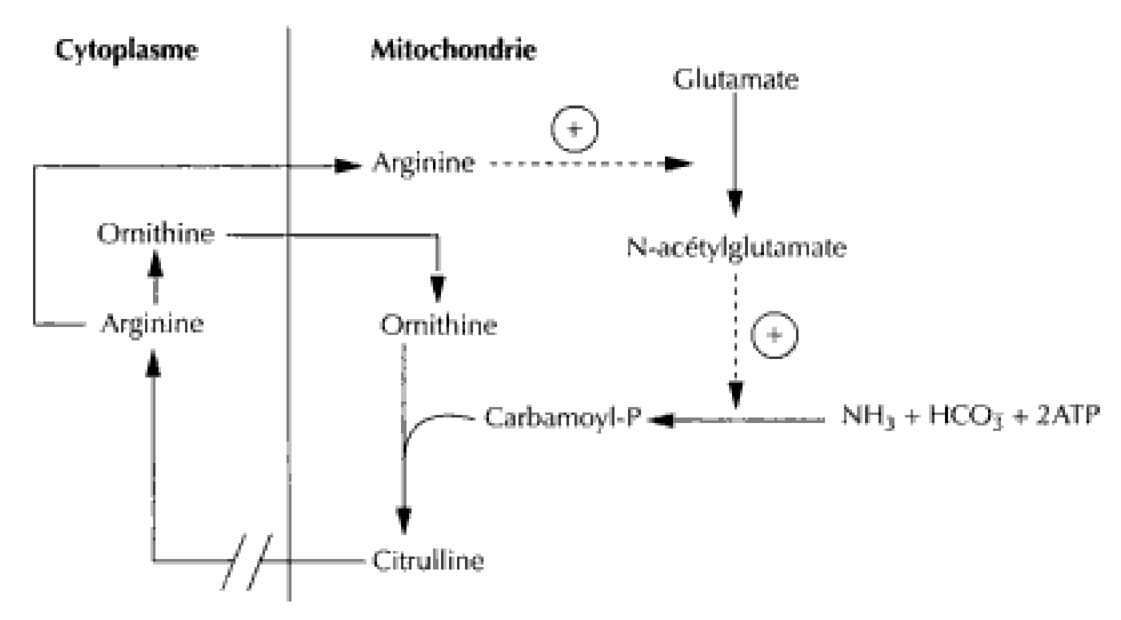



**Figure 4.** Le couple N-acétylglutamate-arginine, régulateur de l'uréogenèse

### 3. Régulation hormonale

Elle peut être *indirecte* en modulant la disponibilité en substrats. Par exemple, le cortisol, en augmentant la protéolyse et l'efflux musculaire des acides aminés, augmente l'uréogenèse. Le glucagon, en augmentant le transport hépatocytaire des acides aminés, stimule également l'uréogenèse. Au contraire, l'insuline diminue l'uréogenèse en orientant les acides aminés vers la synthèse protéique.
Elle peut être *directe* sur la synthèse des enzymes du cycle de l'urée. Une telle action a été rapportée pour le cortisol et le glucagon.

# II. Ammoniogenèse

On appelle « ammoniogenèse » la biosynthèse d'ammoniac par les cellules tubulaires proximales rénales ou, accessoirement, par les cellules distales.
Quoique divers acides aminés et les nucléotides puriques concourent à la synthèse d'ammoniac par le rein, la glutamine est de loin le précurseur le plus important (70 à 80 % de l'ammoniac formé par le rein).
*Remarque* : le terme « ammoniogenèse » est pris ici au sens d'une synthèse d'ammoniac en vue de son élimination sous cette forme. On parle souvent d'« ammoniogenèse intestinale ». Celle-ci est assurée par :

- l'hydrolyse de l'urée (diffusant dans la lumière intestinale) par les uréases bactériennes ;
- la désamination des acides aminés par les bactéries présentes dans le côlon.

Toutefois, en l'absence d'atteinte hépatique sévère, le foie capte et transforme en urée la quasi-totalité de l'ammoniac d'origine intestinale (voir plus haut).
De même, au niveau du muscle, le métabolisme de certains acides aminés et des bases puriques et pyrimidiques provoque la libération de quantités non négligeables d'ammoniac. Mais la plus grande part de cet ammoniac est utilisée *in situ* pour former de la glutamine.

## A. Voie de l'ammoniogenèse

### 1. Transport cellulaire de la glutamine

La glutamine pénètre dans les cellules rénales tant par leur pôle basal (elle provient alors du sang) que par leur pôle tubulaire (elle provient alors du filtrat glomérulaire).

### 2. Désamination de la glutamine

Trois enzymes concourent à la désamination de la glutamine.

#### a) Glutaminase phosphodépendante

Il s'agit d'une enzyme localisée sur la membrane interne des mitochondries, existant sous une forme monomérique inactive (MM 160 000 Da) et sous une forme

dimérique active. La dimérisation est sous la dépendance du Pi. L'enzyme est inhibée par son produit de réaction, le glutamate.

Glutamine $\xrightarrow{NH_3}$ Glutamate

Glutamine | Glutamate

#### b) Glutaminase phospho-indépendante (PIG)

Cette enzyme, localisée au niveau des membranes microsomales et des bordures en brosse, possède à la fois une activité glutaminasique et une activité gamma-glutamyltranspeptidase :

glutamine + glutamine → gamma-glutamylglutamine + $NH_3$
gamma-glutamylglutamine → oxoproline + glutamine
oxoproline → glutamate + $NH_3$
soit au total :
glutamine → glutamate + $NH_3$

#### c) Glutaminase II

Ce système, cytoplasmique et mitochondrial, se décompose en deux enzymes, une transaminase et une oméga-amidase :

Glutamine $\xrightarrow{\text{cétoacide} \rightarrow \text{AA}}$ α-cétoglutaramate $\xrightarrow{NH_3}$ α-cétoglutarate

Glutamine | α-cétoglutaramate | α-cétoglutarate

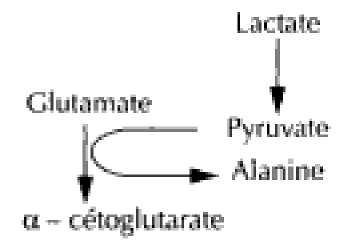
La part de ce système dans l'ammoniogenèse est très faible, inférieure à 5 %.

### 3. Catabolisme du glutamate

Le glutamate formé par déamidation de la glutamine (par les glutaminases phosphodépendante et phospho-indépendante) peut suivre deux voies métaboliques.

#### a) Voie de transamination

Cette voie rend compte, à l'état normal, d'environ 50 % de l'utilisation du glutamate.




Elle n'est pas inductible par l'acidose et n'augmente que lorsqu'il existe une hyperlactacidémie.

### b) Voie de désamination

La réaction est catalysée par une enzyme mitochondriale, la glutamate déshydrogénase :

$$\underset{\text{Glutamate}}{{}^{-}OOC-CH(NH_3^{+})-(CH_2)_2-COOH} \xrightarrow[H_2O \quad NH_3]{NAD^{+} \quad NADH,H^{+}} \underset{\alpha\text{-cétoglutarate}}{COOH-C(=O)-(CH_2)_2-COOH}$$

L'enzyme est inductible par l'acidose : la diminution du pH augmente l'affinité de l'enzyme pour le glutamate.

*Remarque* : au cours de son métabolisme ultérieur, l'α-cétoglutarate libère une molécule d'$HCO_3^-$ réabsorbée dans la circulation.

## 4. Destinée du $NH_3$ produit

À peu de chose près, chaque molécule de glutamine captée par les cellules rénales produit deux molécules de $NH_3$. Le $NH_3$ étant une molécule très diffusible, il passe très facilement dans la lumière tubulaire. Le pKa du système $NH_3 + H^+ \rightarrow NH_4^+$ étant égal à 9, aux pH urinaires (acides), l'ammoniac se combine avec un proton pour donner l'ion ammonium ($NH_4^+$). Le $NH_4^+$ est en revanche très peu diffusible et est donc piégé dans les urines où il se combine à des anions.

# B. Régulation de l'ammoniogenèse

Elle est assurée essentiellement par les produits des réactions, glutamate et ammoniac, qui inhibent respectivement les glutaminases et la glutamate déshydrogénase, et par le pH.

Au cours d'une acidose, l'abaissement du pH urinaire entraîne une séquestration accrue de $NH_3$ sous forme de $NH_4^+$ dans l'urine. Dans ces conditions, la concentration du $NH_3$ dans les cellules diminue, déplaçant l'équilibre de la réaction catalysée par la glutamate déshydrogénase dans le sens de la consommation du glutamate. Il s'en suit une activation des glutaminases. Cette levée d'inhibition, due à l'accéléra-

tion du flux des substrats, est renforcée par une action directe au niveau des enzymes : la diminution du pH entraîne une augmentation de l'affinité des glutaminases et de la glutamate déshydrogénase respectivement pour la glutamine et le glutamate.

### C. Importance métabolique de l'ammoniogenèse rénale

Alors que l'ammoniogenèse rénale ne représente normalement qu'une faible part de l'élimination de l'azote excédentaire, cette voie métabolique prend toute son importance en situation d'acidose, soit, selon la conception classique, en favorisant l'élimination urinaire des protons et la réabsorption des bicarbonates, soit, suivant des théories plus récentes, en réduisant l'utilisation métabolique des bicarbonates (voir ci-dessous).

## III. Relation entre uréogenèse et ammoniogenèse : maintien de l'homéostasie acide-base

Les données présentées dans les paragraphes précédents soulignent le rôle clé de la glutamine comme donneur d'azote pour la synthèse hépatique de l'urée et pour la synthèse rénale d'ammoniac. *A priori* complémentaires pour l'élimination de l'azote, uréogenèse et ammoniogenèse apparaissent en réalité comme des processus alternatifs, notamment en situation pathologique. En cas d'acidose, l'organisme doit augmenter sa production de glutamine pour satisfaire aux besoins rénaux. Le maintien d'une uréogenèse élevée serait en opposition avec la lutte contre l'acidose. L'existence de compartiments métaboliques dans le foie rend possible une adaptation en fonction de l'état acidobasique. Le foie comprend en effet deux populations d'hépatocytes :

- les hépatocytes périportaux (93 % du total) qui possèdent une activité glutaminase et les enzymes du cycle de l'urée ;
- les hépatocytes périveineux qui représentent seulement 7 % du total mais ont une activité métabolique cent fois supérieure à celle des hépatocytes périportaux. Ces cellules contiennent une glutamine synthétase.

Catabolisme et synthèse hépatique de glutamine sont donc deux processus qui fonctionnent simultanément mais à une vitesse différente selon la situation (*fig.* 5).

- En phase postprandiale, l'activité glutaminasique est très importante (voir plus haut). Les hépatocytes périveineux ne récupèrent que de faibles quantités de NH3 et le foie est consommateur de glutamine.
- En phase interprandiale, utilisation et synthèse de glutamine s'équilibrent et le bilan est nul.
- En cas d'acidose, la glutaminase hépatique est inhibée. En effet, cette enzyme est très sensible au pH : une diminution du pH de 7,4 à 7,2 inhibe la glutaminase de 80 %. La synthèse d'urée en est d'autant plus réduite que :
  - la production de N-acétylglutamate, activateur obligatoire de la CPS-1 (voir plus haut), diminue consécutivement à la réduction de la disponibilité en glutamate ;

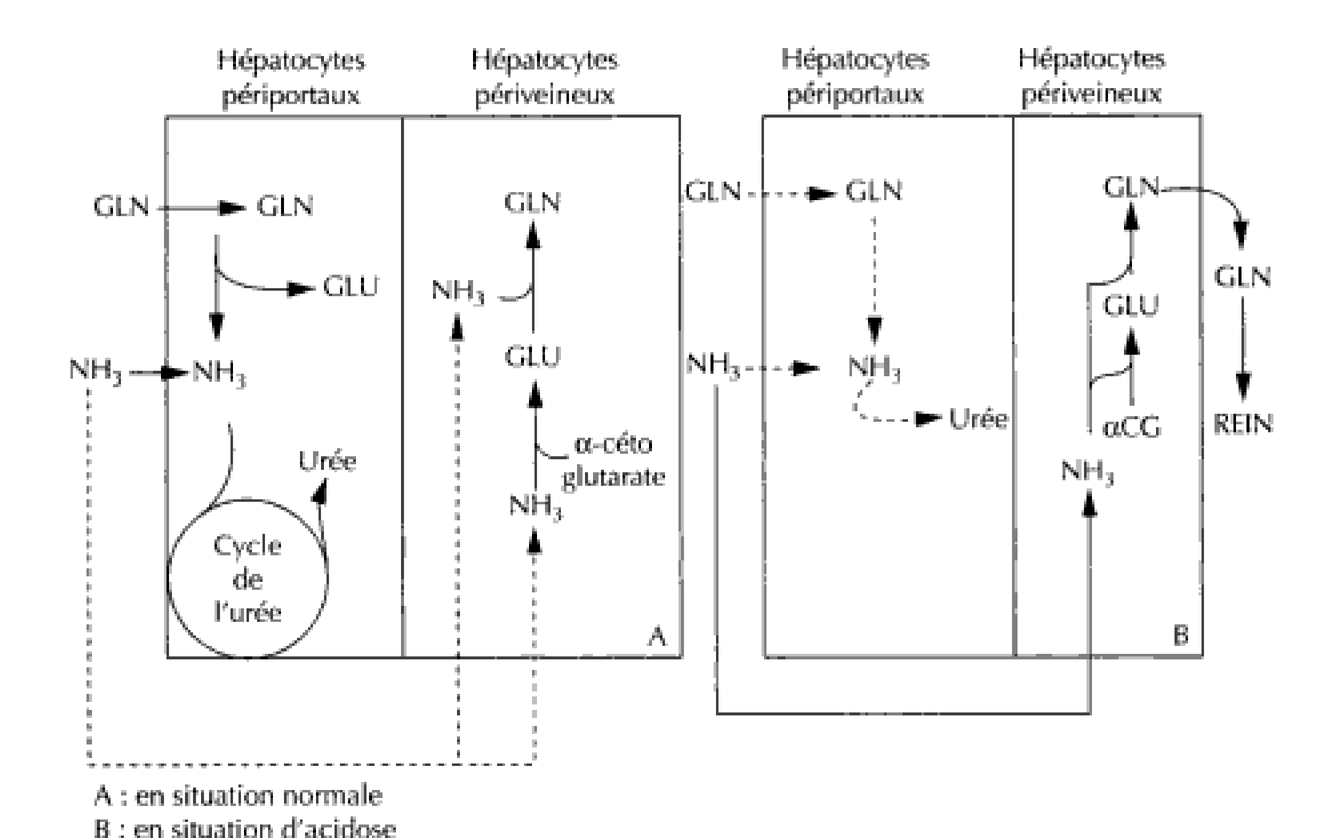



**Figure 5.** Métabolisme hépatique de la glutamine

– l'acidose déplace l'équilibre $NH_3$-$NH_4^+$ vers la formation de $NH_4^+$ alors que la CPS-I utilise préférentiellement $NH_3$ et pratiquement pas $NH_4^+$.

N'étant plus utilisé au niveau périportal, l'ammoniac est disponible pour la synthèse de glutamine au niveau périveineux. Cette action est renforcée par l'inhibition pH-dépendante du transport cellulaire de nombreux acides aminés, dont l'alanine et la glutamine. Ainsi, en situation d'acidose, la consommation périportale de glutamine décroît et la production périveineuse de cet acide aminé s'accroît considérablement. Le foie produit donc de grandes quantités de glutamine disponibles pour le rein, où son métabolisme s'oppose à l'acidose.

*Remarque importante* : contrairement à la glutaminase hépatique, les glutaminases rénales sont activées par la diminution de pH. Cette donnée illustre bien le fonctionnement synchrone du foie et du rein vis-à-vis du métabolisme de la glutamine.

L'inhibition de la glutaminase et de l'uréogenèse hépatique concourt à la lutte contre l'acidose par un second mécanisme non moins important : en effet, l'uréogenèse peut être vue comme la neutralisation réciproque de deux $NH_4^+$ et deux $HCO_3^-$

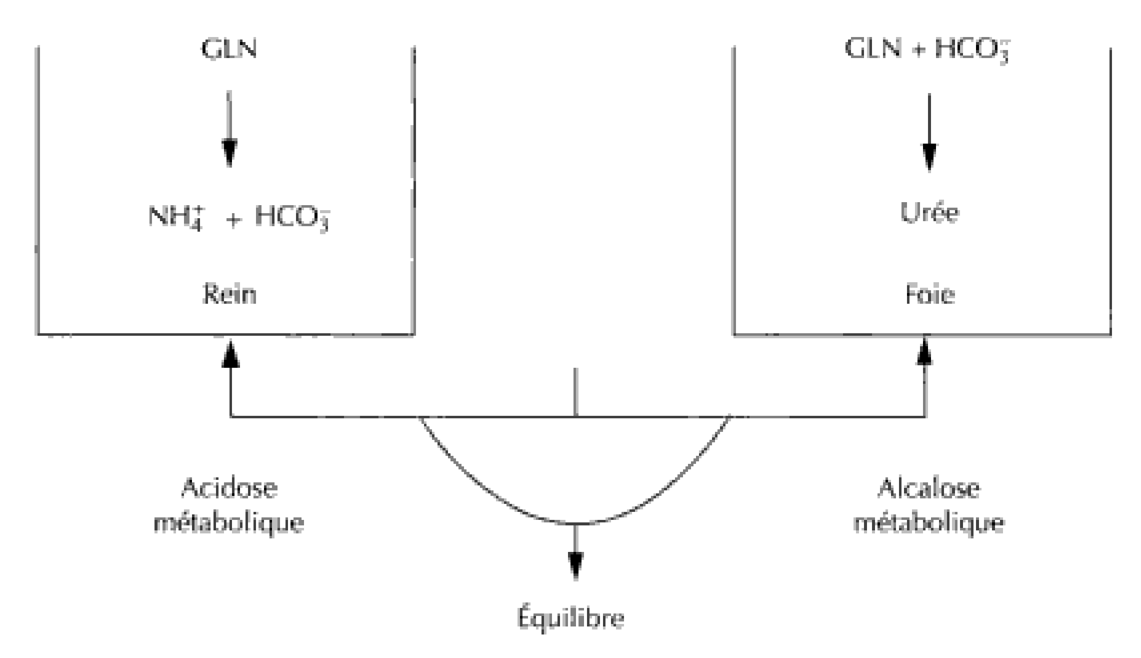
$$2\ NH_4^+ + HCO_3^- \rightarrow \text{urée} + H^+ + 2\ H_2O$$
$$H^+ + HCO_3^- \rightarrow CO_2 + H_2O$$
$$\overline{2\ NH_4^+ + 2\ HCO_3^- \rightarrow \text{urée} + CO_2 + 3\ H_2O}$$

L'inhibition de l'uréogenèse en situation d'acidose conduit donc à l'économie de $HCO_3^-$ qui concourt à l'homéostasie acide-base.

Pour certains, la modulation de la consommation hépatique de $HCO_3^-$ est une fonction de l'uréogenèse aussi importante que celle de détoxification de l'azote.

# Conclusion

Uréogenèse et ammoniogenèse sont, chez l'homme, les deux principaux processus d'élimination de l'azote excédentaire. Toutefois, à l'état normal, l'importance quantitative de ces deux voies est très différente puisque l'uréogenèse concourt à l'épuration de 90 % de l'azote et l'ammoniogenèse seulement de 2,5 à 4,5 %. À côté de cette fonction, ces deux voies métaboliques jouent un rôle fondamental dans le contrôle de l'équilibre acide-base en grande partie par l'intermédiaire de la régulation du métabolisme d'un acide aminé, la glutamine (*fig. 6*).




(D'après Welbourne TC. *in* : Häussinger D, pH homeostasis, mechanisms and control. Academic Press, 1988 : 379-401.)

**Figure 6.** Rôle de la glutamine (GLN), de l'ammoniogenèse et de l'uréogenèse dans l'équilibre acide-base.

***Pour en savoir plus***

- Cynober L. *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*. Springer Verlag, 2001.
- Cynober L. Metabolic and therapeutic apsects of amino acids in clinical nutrition. Boca Raton (États-Unis) CRC Press, 2004.
- Cynober L. « Amino acid metabolism » in *Encyclopedia of biological chemistry* (Elsevier Inc., New York, États-Unis) 2004 ; 1 : 90-5.
- Giraudet P. *Biochimie tissulaire humaine*. Tome 5 : *Le Rein*. Paris, Maloine, 1980.
- Häussinger D. *pH Homeostasis, mechanism and control*. San Diego (États-Unis), Academic Press, 1988.
- Meijer A. J., Lamers W. H., Chamuleau R. A. Nitrogen metabolism and ornithine cycle function. *Physiol Rev* 1990 ; 70 : 701-48.



# Cétogenèse

N. MOATTI, B. BAUDIN
Laboratoire de biochimie, UFR de pharmacie, Paris-XI.

*La cétogenèse est la formation par l'organisme de corps cétoniques. Le terme de « corps cétoniques », impropre mais consacré par l'usage, définit un groupe de trois métabolites normaux de l'organisme : l'acétoacétate, le 3-hydroxybutyrate et l'acétone.*
*Considérés pendant longtemps comme des produits de déchets d'un métabolisme anormal, il est actuellement bien établi que les corps cétoniques sont des substrats énergétiques à la fois pour le cerveau et les tissus périphériques susceptibles de remplacer, dans certaines circonstances, les autres nutriments, glucose et acides gras.*
*Après avoir rappelé les mécanismes de la cétogenèse, nous traiterons de sa régulation et donnerons ses avantages métaboliques.*

# I. Mécanismes de la cétogenèse

Les corps cétoniques sont synthétisés essentiellement par le foie. La cétogenèse extrahépatique ne joue qu'un rôle mineur : le rein produit une petite quantité d'acétoacétate qui est utilisée localement.

## A. Séquences métaboliques et principaux corps cétoniques

Processus intramitochondrial, la cétogenèse comporte quatre étapes :

1 - Synthèse de l'acéto-acétyl-CoA :

Acétyl-CoA + Acétyl-CoA $\overset{1}{\rightleftharpoons}$ Acétoacétyl-CoA + CoA

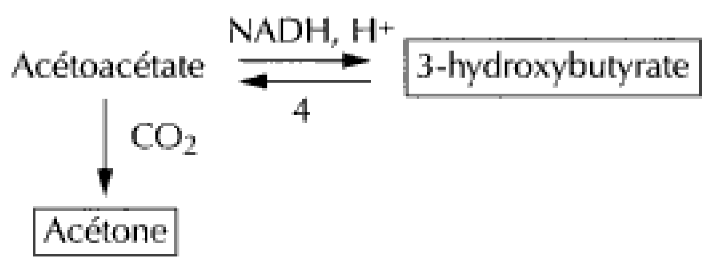
2 - Synthèse du 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (3-HMG-CoA) :

Acétoacétyl-CoA + Acétyl-CoA + $H_2O$ $\xrightarrow{2}$ 3-HMG-CoA + CoA

3 - Synthèse de l'acétoacétate :

3-HMG-CoA $\xrightarrow{3}$ Acétoacétate + acétyl-CoA

4 - Synthèse du 3-hydroxybutyrate :




*(1) Acétoacétyl-CoA thiolase*
*(2) HMG-CoA synthase*
*(3) HMG-CoA lyase*
*(4) 3-hydroxybutyrate deshydrogénase*

Les trois principaux corps cétoniques sont donc :
- l'acétoacétate $CH_3$-$CH_2$-CO-COOH
- le 3-hydroxybutyrate $CH_3$-$CH_2$-CHOH-COOH
- l'acétone $CH_3$-CO-$CH_3$.

Les quatre enzymes impliquées dans la cétogenèse ont été retrouvées dans divers tissus extrahépatiques. Cependant, l'HMG-CoA synthase, considérée comme l'enzyme limitante de la séquence métabolique aboutissant à la formation des corps cétoniques, n'est présente que dans le foie, faisant de cet organe le site privilégié de la cétogenèse. L'équilibre entre le 3-hydroxybutyrate et l'acétoacétate est contrôlé par le rapport mitochondrial entre $NAD^+$ et NADH, $H^+$. L'acétone est formée par décarboxylation spontanée de l'acétoacétate en excès : elle est partiellement éliminée par voie respiratoire (odeur acétonique de l'haleine par exemple dans les affections hépatiques et le coma diabétique acido-cétonique). Ces trois corps cétoniques sont éliminés partiellement par voie rénale (corps cétoniques dans les urines). Leurs concentrations plasmatiques sont faibles (< 0,25 mmol/l à jeun), avec trois fois plus de 3-hydroxybutyrate que d'acéto-acétate, tous deux sont des acides faibles donc presque entièrement ionisés en pH de l'organisme. Une cétose ou accumulation des corps cétoniques dans les liquides extracellulaires apparaît en cas de déséquilibre entre la production (cétogenèse) et l'utilisation tissulaire (cétolyse). En règle générale, une augmentation de la cétonémie correspond davantage à une activation de la cétogenèse qu'à un ralentissement de la cétolyse.

## B. Origine des substrats

L'acétyl-CoA, substrat de base de la cétogenèse, peut avoir plusieurs origines.

### 1. Acides gras à longues chaînes

La β-oxydation mitochondriale des acides gras à longue chaîne est la source principale des molécules d'acétyl-CoA au niveau hépatique. Les acides gras qui parviennent au foie proviennent de l'hydrolyse des triglycérides stockés dans le tissu adipeux et des lipoprotéines circulantes.

Les acides gras sont activés en acyl-CoA par des acyl-CoA synthétases variant selon la longueur de la chaîne. Le passage au travers de la membrane mitochondriale des acyl-CoA s'effectue grâce à l'intervention de la carnitine et implique trois enzymes :
- la *carnitine palmitoyltransférase de type I*, qui assure, au niveau de la membrane externe mitochondriale, le transfert sur la carnitine des acyl-CoA (carnitine + acyl-CoA → acylcarnitine) ;
- la *carnitine acylcarnitine translocase* qui assure la diffusion des acylcarnitines formées dans l'espace intermembranaire, jusqu'à la membrane mitochondriale interne ;
- la *carnitine palmitoyltransférase de type II*, qui libère dans la mitochondrie les acyl-CoA qui seront dégradés par β-oxydation. Ce processus couvre la presque totalité des besoins énergétiques hépatiques. Les molécules d'acétyl-CoA formées peuvent s'engager dans diverses voies dont l'importance varie en fonction des conditions métaboliques de l'hépatocyte : la cétogenèse constitue une de ces voies (voir « *Régulation de la cétogenèse* »).

### 2. Pyruvate

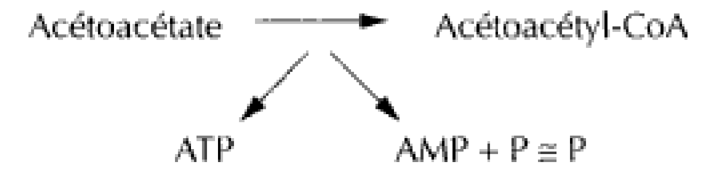
La décarboxylation oxydante du pyruvate par le complexe pyruvate-déshydrogénase aboutit à la formation d'acétyl-CoA. Le pyruvate provient soit du glucose par la voie glycolytique (dans les conditions physiologiques, la glycolyse hépatique est très faible), soit du lactate, soit du métabolisme de divers acides aminés (alanine, notamment).
Dans le foie, la formation d'acétyl-CoA à partir du pyruvate est limitée car la pyruvate déshydrogénase est inhibée par les quantités importantes d'acétyl-CoA et d'adénosine triphosphate (ATP) provenant de la dégradation des acides gras : le pyruvate s'engage essentiellement vers la gluconéogenèse.

### 3. Leucine et isoleucine

Le catabolisme de ces deux acides aminés conduit à la formation d'acétyl-CoA. Mais si la leucine est potentiellement cétogénique, son rôle reste négligeable dans la mesure où cet acide aminé n'est pas utilisé à des fins énergétiques dans le foie.

## C. Cétolyse

Chez l'homme, les corps cétoniques produits par le foie sont utilisables par les tissus périphériques ; par le NADH, H+, le 3-hydroxybuturate peut redonner l'acétoacétate (voir plus haut) et ce dernier l'acétylCoA selon :




Réaction catalysée par une thiokinase périphérique.
L 'acétoacétyl-CoA peut redonner 2 acétyl-CoA (réaction inverse de celle vue plus haut), utilisables dans le cycle de Krebs. Même l'acétone est en partie réutilisable à des fins énergétiques soit par la conversion en glycérol, soit en redonnant de l'acétyl CoA.

# II. Régulation de la cétogenèse

Divers mécanismes permettent d'adapter la cétogenèse selon l'utilisation des corps cétoniques. Cette régulation, parfaitement coordonnée avec les autres métabolismes, s'effectue principalement au niveau du tissu adipeux et du foie. Deux conditions doivent être requises pour qu'il y ait cétogenèse :

- le foie doit disposer d'une quantité suffisante de substrats précurseurs représentés essentiellement par les acides gras circulants produits par le tissu adipeux ;
- le métabolisme intrahépatique et sa régulation doivent permettre la formation des corps cétoniques.

## A. Régulation extrahépatique

L'équilibre entre la biosynthèse des triglycérides et leur hydrolyse, au niveau du tissu adipeux, conditionne la quantité d'acides gras circulants. Cet équilibre est lui-même dépendant des conditions nutritionnelles et hormonales.

Divers agents stimulent la lipolyse adipocytaire (catécholamines, glucagon, cortisol, etc.). Une augmentation de la quantité d'acides gras stimule la cétogenèse non seulement par un effet de masse mais également en orientant le métabolisme hépatique des acides gras vers la cétogenèse.

L'insuline joue un rôle déterminant : elle est le principal facteur anticétogénique en exerçant à la fois un effet antilipolytique direct et un effet lipogénique ; elle s'oppose aux effets cétogéniques des catécholamines, glucagon et cortisol.

Les corps cétoniques eux-mêmes peuvent freiner leur propre synthèse par deux mécanismes : ils stimulent la sécrétion d'insuline et s'opposent à la libération des acides gras par le tissu adipeux.

## B. Régulation hépatique

Contrairement au tissu adipeux soumis à un impact hormonal direct, le métabolisme hépatique est contrôlé par divers métabolites intervenant au niveau d'enzymes-clés.

Un *premier carrefour de régulation* concerne la répartition des acides gras entre leurs deux voies d'utilisation hépatique : estérification et incorporation dans les lipoprotéines plasmatiques d'une part, oxydation mitochondriale d'autre part.

Le malonyl-CoA, produit de la première réaction de la synthèse des acides gras catalysée par l'acétyl-CoA carboxylase, joue un rôle déterminant dans la régulation de la cétogenèse : à doses micromolaires, il inhibe la carnitine acyltransférase-I (CAT-1) et s'oppose au transfert intramitochondrial et à l'oxydation des acides gras. La concentration hépatique de ce métabolite dépend de l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase modulée elle-même par les taux respectifs d'Insuline (I) et de glucagon (G), et par les concentrations d'acides gras et de citrate.

Deux situations opposées peuvent se rencontrer :

- *si les apports de glucose sont élevés,* le rapport G/I diminue, l'acétyl-CoA carboxylase qui contrôle la synthèse du malonyl-CoA est activée, la CAT-1 est inhibée et par là même la cétogenèse. Dans ces conditions, le rôle physiologique du malonyl-CoA est d'assurer le flux unidirectionnel des atomes de carbone du glucose (ou d'autres précurseurs du pyruvate) vers la formation de triglycérides et de lipoprotéines ;
- *si les apports de glucose sont faibles,* le rapport G/I augmente, la concentration de malonyl-CoA est faible, l'inhibition de la CAT-1 est levée, ce qui permet l'oxydation des acides gras et la cétogenèse.

Il est important de noter que les conditions de carence glucidique qui stimulent la production des corps cétoniques entraînent parallèlement une augmentation de la concentration hépatique de carnitine et une déplétion des stocks de glycogène favorables à l'activité de la CAT-1.

Au total, les taux intracellulaires d'acides gras (substrats de la CAT), de carnitine (cosubstrat de la CAT) et de malonyl-CoA (inhibiteur de la CAT) contrôlent directement ou indirectement la production de corps cétoniques par le foie.

Le *deuxième carrefour métabolique de régulation* se situe au niveau de l'utilisation du produit de la β-oxydation des acides gras, l'acétyl-CoA, soit vers la synthèse d'acétoacétyl-CoA (cétogenèse), soit vers la synthèse de citrate (métabolisé par le cycle de Krebs ou source d'acétyl-CoA cytoplasmique).

L'acétoacétyl-CoA thiolase et l'HMG-CoA synthase qui catalysent les deux premières réactions de la cétogenèse (voir avant) sont inhibées par l'acétoacétyl-CoA. La concentration de ce métabolite dépend en grande partie du rapport NADH, $H^+/NAD^+$ : une augmentation du taux de NADH, $H^+$ (consécutive à la β-oxydation des acides gras) diminue sa concentration et permet à la cétogenèse de s'effectuer.

L'utilisation de l'acétyl-CoA par le cycle de Krebs est principalement liée à la disponibilité en oxaloacétate (acétyl-CoA + OAA → citrate), elle-même fonction de l'équilibre existant entre le taux de formation (carboxylation du pyruvate issu des précurseurs glycogéniques) et le taux d'utilisation pour les besoins de la gluconéogenèse. La cétogenèse et la gluconéogenèse sont des processus interdépendants : cependant, leurs intensités respectives dépendent de l'apport au foie des substrats nécessaires à la gluconéogenèse (acides aminés, notamment alanine, lactate, etc.). Si ces derniers sont présents en quantité peu importante, les concentrations de pyruvate et d'oxaloacétate sont faibles et la gluconéogenèse tend à décroître au profit de la cétogenèse. Dans le cas contraire, la concentration d'oxaloacétate augmente, dépassant les possibilités d'utilisation pour la gluconéogenèse. L'excès d'oxaloacétate permet à l'acétyl-CoA de s'engager dans la voie de synthèse du citrate et la cétogenèse diminue. Notons cependant que le niveau d'activité du cycle de Krebs reste faible tant que persistent les conditions métaboliques favorables à la gluconéogenèse et à la cétogenèse (fourniture d'ATP et de pouvoir réducteur par le catabolisme des acides gras). Au total, la cétogenèse est peu importante quand la production hépatique de glucose est accrue. Ces données permettent d'expliquer l'effet anticétogénique direct de l'alanine. Inversement, les corps cétoniques sont capables, en freinant la protéolyse musculaire, de contrôler indirectement la production de glucose.

Certaines circonstances (jeûne prolongé sévère, diabète non contrôlé) conduisent à une surproduction de corps cétoniques. Dans les deux cas, la gluconéogenèse « détourne » l'oxaloacétate, entraînant une déplétion des intermédiaires du cycle de Krebs, ce qui accroît la conversion d'acétyl-CoA en acétoacétate (le coenzyme A libéré permet à la β-oxydation des acides gras de se poursuivre). La surproduction hépatique des corps cétoniques dépassant la capacité qu'ont les tissus extrahépatiques de les oxyder majore les concentrations circulantes d'acétoacétate et de 3-hydroxybutyrate, créant ainsi une acidose métabolique.

## III. Avantages métaboliques de la cétogenèse

La cétogenèse doit être intégrée dans le contexte général des besoins énergétiques de l'organisme. Toute diminution de l'apport en glucose va entraîner une augmentation de la lipolyse adipocytaire. Les acides gras libérés dans la circulation et qui n'ont pas été utilisés par les tissus extrahépatiques sont captés par le

foie. La stimulation de la cétogenèse qui en résulte présente un certain nombre d'avantages :

- les corps cétoniques sont solubles dans l'eau et pénètrent plus facilement dans les tissus que les acides gras ;
- les corps cétoniques sont utilisés préférentiellement par certains tissus, les muscles squelettiques comme le myocarde et surtout le cerveau (ce dernier organe n'est pas capable d'utiliser les acides gras) ;
- les corps cétoniques épargnent le glucose circulant disponible pour les tissus exclusivement glucodépendants ;
- les corps cétoniques ont une action antilipolytique, ce qui évite une libération excessive d'acides gras ;
- les corps cétoniques diminuent la protéolyse musculaire et épargnent ainsi le capital protéique de l'organisme.

## L'essentiel de la question

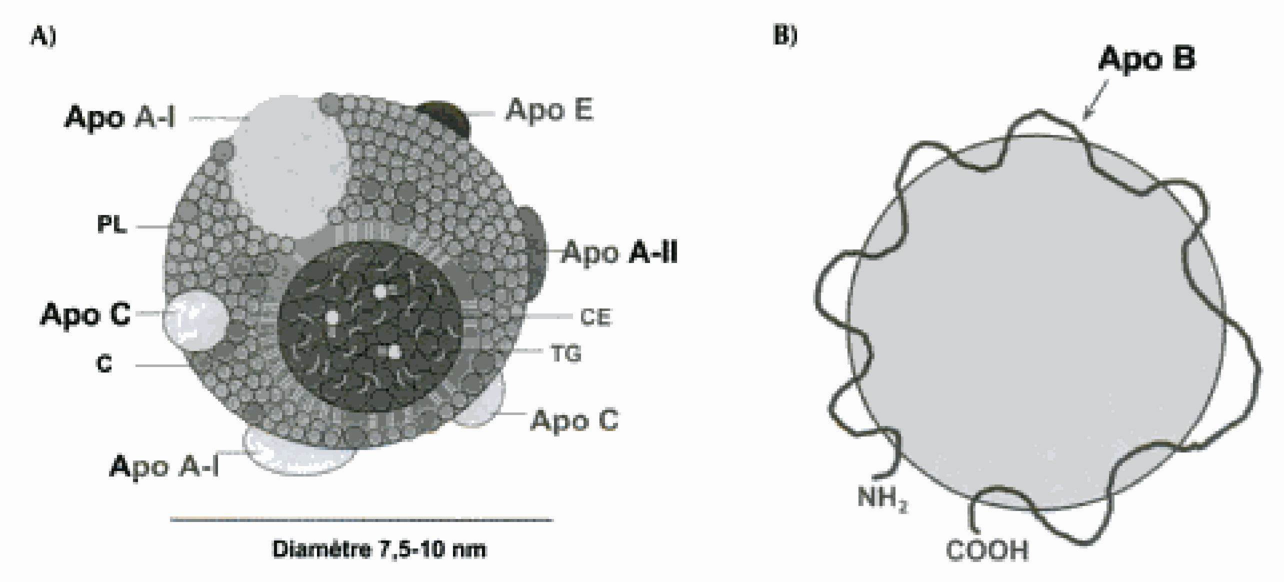
La cétogenèse est la formation des corps cétoniques qui sont principalement le 3-hydroxybutyrate, l'acéto-acétate et l'acétone. Ils sont synthétisés essentiellement dans les hépatocytes au cours de réactions catalysées par des enzymes mitochondriales et à partir de divers substrats eux-mêmes potentiellement énergétiques par l'acétylCoA ; les acides gras à longues chaînes sont les principaux fournisseurs d'acétylCoA, viennent ensuite le pyruvate et certains acides aminés. La cétogenèse est finement régulée, au niveau extra-hépatique par des hormones, l'insuline qui est anti-cétogénique, les catécholamines, glucagon et cortisol, eux manifestant des effets cétogéniques, et au niveau hépatique par les apports de glucose et d'acides gras, cétogenèse et gluconéogenèse étant des processus inter-dépendants. Les corps cétoniques sont solubles dans l'eau et passent facilement dans les tissus, ils représentent un apport énergétique important, en particulier au cours du jeûne prolongé en épargnant le capital protéique de l'organisme et le glucose circulant disponible pour les tissus exclusivement glucodépendants comme le cerveau. Les corps cétoniques circulent dans le plasma (cétonurie) et sont éliminés, si non utilisés ou si produits en excès, par le rein (cétonémie). Leurs recherche et dosage (du 3-hydroxy-butyrate essentiellement) sont utiles dans le cadre du diagnostic du coma diabétique acido-cétosique et chaque fois qu'un excès d'activation de la cétogenèse est suspecté, comme l'intoxication alcoolique.

# Structure et métabolisme des lipoprotéines

S. LESTAVEL, A. TAILLEUX
Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques, Université Lille-II, et Inserm U545, Institut Pasteur de Lille.
T. BROUSSEAU, Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques, Université Lille-II, et Inserm U744, Institut Pasteur de Lille.

*Il existe deux organes principaux fournissant les lipides à l'organisme : l'intestin (lipides exogènes) et le foie (lipides endogènes). Ces lipides sont prioritairement utilisés par tous les tissus de l'organisme, même si la plupart d'entre eux sont capables de synthétiser certains lipides, et en particulier le cholestérol. Les lipides, molécules hydrophobes, circulent dans le sang en association avec des protéines spécifiques, les apolipoprotéines, sous forme de complexes macromoléculaires solubles en milieux aqueux appelés lipoprotéines.*

*Les lipoprotéines plasmatiques ont généralement une structure sphérique dans laquelle le « noyau » est constitué de lipides très hydrophobes : triglycérides (TG) et cholestérol estérifié (CE). L'enveloppe est composée de phospholipides (PL) choliniques, de cholestérol non estérifié (C) et d'apolipoprotéines (apo). La structure tertiaire des apolipoprotéines contient des zones hydrophobes incluses dans la masse lipidique et des zones hydrophiles tournées vers l'extérieur (milieu plasmatique) (fig. 1).*




C, cholestérol ; CE, cholestérol estérifié ; TG, triglycérides ; PL, phospholipides ; apo, apolipoprotéine.

**Figure 1.** Représentation schématique d'une lipoprotéine plasmatique A) de type HDL avec son cœur hydrophobe et sa surface polaire et B) de type LDL avec la chaîne peptidique de l'apo B100 (le long de la séquence, on peut observer des zones hydrophiles situées à l'extérieur de la lipoprotéine et des zones hydrophobes enfouies dans la masse lipidique)

*Les lipoprotéines peuvent véhiculer des enzymes et des protéines de transfert des lipides indispensables à leur métabolisme, ainsi que des molécules ayant une certaine affinité pour les lipides (albumine, glycolipides, peptides, urée, pigments...). Les lipoprotéines peuvent aussi jouer le rôle de transporteurs pour des molécules hydrophobes comme des vitamines ou des médicaments.*

*Les associations moléculaires non covalentes que forment les lipoprotéines subissent dans la circulation sanguine des remaniements permanents : des échanges et des transferts ont lieu entre les différentes lipoprotéines et avec les cellules. La composition des lipoprotéines résulte donc d'un équilibre dynamique dépendant de l'apport alimentaire, des activités de l'organisme et des agressions dont il est l'objet. On peut constater aussi une grande hétérogénéité des lipoprotéines qui rend difficile leur classification et leur dosage.*

*Nous décrirons tout d'abord les principaux composants des lipoprotéines, puis nous verrons comment ils s'organisent dans les lipoprotéines. Cela nous conduira à discuter*

*des différentes classifications proposées. Enfin, nous verrons comment la structure des lipoprotéines évolue au cours du métabolisme physiologique chez l'homme. Nous ne traiterons pas des différents modèles animaux du métabolisme des lipoprotéines, mais il faut savoir qu'il est très variable d'une espèce à une autre et qu'il faut en tenir compte dans les études pharmacologiques.*

# I. Structure des lipoprotéines plasmatiques

## A. Composants des lipoprotéines

### 1. Lipides

La plupart des lipides contenus dans les lipoprotéines (*fig.* 2) sont synthétisés dans les cellules intestinales à partir des apports alimentaires ou dans les cellules hépatiques. L'alimentation occidentale apporte environ 40 % de l'énergie sous forme de lipides (essentiellement des triglycérides) alors que les nutritionnistes préconisent un apport de 33 %. L'apport quotidien de lipides alimentaires est de 100 à 150 g. Les lipides sont indispensables aux cellules comme précurseurs dans un grand nombre de biosynthèses spécifiques (lipides membranaires, hormones stéroïdes) ou comme source d'énergie.



**Le glycérol, le cholestérol et la glycérophosphatidylcholine sont estérifiés par des acides gras (R—CO—OH) pour former les esters de cholestérol, les triglycérides et les phospholipides.**

**Figure 2.** Formule chimique des principaux lipides plasmatiques

Les acides gras (AG) qui permettent de former les esters de cholestérol, les triglycérides et les phospholipides varient par leur longueur et leur degré d'insaturation. La nature de ces acides gras dépend en partie des apports alimentaires et semble influencer le métabolisme des lipoprotéines bien que les mécanismes mis en jeu soient actuellement mal connus. Les acides gras peuvent circuler dans le plasma sous forme non estérifiée. Ils sont alors associés à l'albumine et ont une demi-vie très courte (quelques minutes).

### a) Cholestérol

Le cholestérol est indispensable au fonctionnement de l'organisme. Il intervient dans la structure des membranes cellulaires et sert de précurseur à la synthèse des hormones stéroïdes. Toutes les cellules de l'organisme ont l'équipement enzymatique nécessaire à la biosynthèse de cholestérol à partir de l'acétate. Cette biosynthèse est régulée par les apports de cholestérol venant des lipoprotéines plasmatiques. La régulation se fait au niveau de l'hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A réductase (HMG-CoA réductase), enzyme clé du métabolisme du cholestérol. Le cholestérol plasmatique provient essentiellement de la synthèse hépatique (0,7 à 0,9 g/j) et de l'apport alimentaire très variable selon les individus (0,1 à 1 g/j). L'estérification du cholestérol est assurée dans le plasma par la lécithine-cholestérol-acyltransférase (LCAT) (*fig. 3*), et dans les cellules par l'acylCoA-cholestérol-acyltransférase (ACAT). Le catabolisme du cholestérol a lieu exclusivement dans l'hépatocyte. Les acides biliaires formés sont excrétés par les voies biliaires et participent à l'absorption intestinale des lipides alimentaires.



**Figure 3.** La LCAT associée aux HDL.

### b) Triglycérides

Les triglycérides sont formés par estérification d'une molécule de glycérol par trois molécules d'acides gras qui peuvent être identiques ou différents. Ils représentent la forme de transport et de stockage des acides gras. Les acides gras constituent une

source importante d'énergie. On estime que leur catabolisme par oxydation fournit plus de 40 % des besoins énergétiques d'un sujet sain ayant un régime équilibré. La biosynthèse des triglycérides plasmatiques s'effectue essentiellement sur trois sites :

- *l'entérocyte* : dans la lumière intestinale, les triglycérides alimentaires sont hydrolysés par la lipase pancréatique. Les acides gras et les 2-monoglycérides libérés sont réabsorbés par l'entérocyte. Dans l'entérocyte, les 2-monoglycérides sont réestérifiés en triglycérides et exportés dans la circulation associés aux lipoprotéines d'origine intestinale, les chylomicrons ;
- *l'hépatocyte* : les acides gras provenant de la synthèse hépatique ou de la circulation réagissent avec le 3-phospho-glycérol provenant de la glycolyse pour former des triglycérides et sont sécrétés dans la circulation associés aux lipoprotéines d'origine hépatique, les VLDL ;
- *l'adipocyte* : les acides gras provenant de l'hydrolyse des triglycérides plasmatiques réestérifient le glycérol et sont stockés sous forme de triglycérides dans l'adipocyte. Ces triglycérides seront réutilisés ultérieurement dans un but énergétique.

### c) Phospholipides

Ce sont essentiellement des phospholipides choliniques (phosphatidyl et lysophosphatidyl cholines) et des sphingomyélines. Ce sont des constituants indispensables des membranes. Leur biosynthèse est hépatique (*de novo*) ou intestinale. Il s'agit dans ce dernier cas de resynthèse à partir des phospholipides alimentaires ou des phospholipides biliaires réabsorbés.

## 2. Apolipoprotéines

Les apolipoprotéines participent à la structure et aux différents processus du métabolisme des lipoprotéines : biosynthèse, sécrétion, maturation et transformation plasmatique, échanges de constituants avec les cellules de l'organisme, et catabolisme.

La nomenclature alphabétique des apolipoprotéines regroupe des protéines ayant des structures et des fonctions très différentes. On connaît actuellement dix apolipoprotéines principales, bien caractérisées, AI, AII, AIV, AV, B, CI, CII, CIII, D et E et une apolipoprotéine particulière, l'apo (a) (*tab. 1*). D'autres apolipoprotéines présentes à l'état de traces et dont le rôle est mal défini ont été découvertes ces dernières années. En dépit de la répartition des gènes des apolipoprotéines sur cinq chromosomes différents, les gènes de la plupart des apolipoprotéines (exceptées les apo B et D) dérivent probablement d'un gène ancestral commun. Contrairement aux apolipoprotéines E et D synthétisées dans de nombreux organes, les apolipoprotéines sont synthétisées exclusivement dans les deux organes responsables de la sécrétion des lipides plasmatiques : l'intestin et le foie.

Les apolipoprotéines étant pour la plupart des protéines sécrétées, elles sont synthétisées sous forme de propeptides et pour certaines de prépropeptides. Des modifications post-traductionnelles (glycosylations, phosphorylations, acylations par les AG, clivage enzymatique des pré- et propeptides…) ont lieu dans la cellule, mais certaines maturations peuvent aussi avoir lieu dans le compartiment plasmatique.

**Tableau 1.** Les principales apolipoprotéines

| Apolipoprotéine (nb d'acides aminés) | Masse moléculaire (kDa) | Site de synthèse | Concentration plasmatique (g/L) | Fonction |
|---|---|---|---|---|
| **Apo AI** (243) | 28 | Foie, intestin | 1,0 à 1,2 | Activation LCAT, Ligand récepteurs HDL |
| **Apo AII** (2 × 77) | 17 | Foie, (intestin) | 0,3 à 0,5 | |
| **Apo AIV** (376) | 46 | Intestin | 0,16 | Activation LCAT |
| **Apo AV** (343) | 39 | Foie | 0,0001 à 0,0002 | Diminution production VLDL Activation hydrolyse TG par LPL |
| **Apo B100** (4 536) | 549 | Foie | 0,7 à 1 | Sécrétion VLDL, ligand LDL-R |
| **Apo B48** (2 152) | 275 | Intestin | 0,03 à 0,05 | Sécrétion chylomicrons |
| **Apo CI** (57) | 6,5 | Foie | 0,04 à 0,06 | |
| **Apo CII** (79) | 8,5 | Foie | 0,03 à 0,05 | Activation LPL |
| **Apo CIII** (79) | 8,75 | Foie | 0,12 à 0,14 | Inhibition LPL, Inhibition liaison LDL-R |
| **Apo D** (169) | 22 | Foie, muscle, placenta, intestin, cerveau… | 0,06 à 0,07 | |
| **Apo E** (299) | 34 | Foie, cerveau, macrophages, tissus stéroïdogènes | 0,03 à 0,05 | Ligand LDL-R, LRP, VLDL-R |
| **Apo (a)** (variable) | 280 à 800 | Foie | 0 à 1 | |

La concentration plasmatique correspond à des valeurs généralement observées. Lorsque les fonctions des apolipoprotéines sont mal connues ou démontrées seulement *in vitro*, elles n'ont pas été signalées.
VLDL, *very low density lipoproteins* ; LDL, *low density lipoproteins* ; HDL, *high density lipoproteins* ; LCAT, lécithine-cholestérol-acyltransférase ; LPL, lipoprotéine lipase ; LDL-R, LDL récepteur ; LRP, LDL *receptor-related protein* ; VLDL-R,VLDL récepteur.

### a) Principales apolipoprotéines

#### ■ *Apolipoprotéine AI*

L'apo AI est l'apolipoprotéine majeure des lipoprotéines de haute densité (HDL). Elle représente environ 70 % de la masse protéique des HDL. Sa concentration plasmatique est d'environ 1,2 g/L. Sa masse moléculaire est de 28 kDa pour 243 acides aminés. Le gène codant l'apo AI est situé sur le chromosome 11 dans un « cluster » comprenant les gènes des apo AI, CIII, AIV et AV. La synthèse de l'apo AI est à peu près également répartie entre l'intestin et le foie. On trouve donc de l'apo AI dans les lipoprotéines d'origine intestinale. L'augmentation de la concentration plasmatique d'apo AI est corrélée à une diminution du risque d'athérosclérose. L'apo AI joue un rôle très important dans le retour du cholestérol des tissus vers le foie par au moins deux mécanismes : d'une part, l'interaction de l'apo AI des HDL naissantes avec les cellules permet la sortie de cholestérol cellulaire, c'est ce qu'on appelle l'efflux de cholestérol. D'autre part, dans les lipoprotéines ayant capté le cholestérol cellulaire, l'apo AI est un activateur de la LCAT responsable de l'estérification du cholestérol plasmatique. Son taux de transfert entre les lipoprotéines est très élevé.

### ■ *Apolipoprotéine AII*

L'apo AII est quantitativement la deuxième apolipoprotéine des HDL et représente environ 20 % de leur masse protéique. Sa concentration plasmatique est de 0,3 à 0,5 g/L. Elle est constituée de deux chaînes protéiques de 77 acides aminés associées par un pont disulfure. Sa masse moléculaire est de 17,4 kDa. Son rôle physiologique est mal connu bien que certaines de ses propriétés *in vitro* soient antagonistes de celles de l'apo AI et qu'une augmentation plasmatique des lipoprotéines riches en apo AII ne soit pas toujours associée à une diminution du risque d'athérosclérose.

### ■ *Apolipoprotéine AIV*

L'apo AIV est essentiellement synthétisée par l'intestin et se trouve dans les lipoprotéines riches en triglycérides et dans les HDL. Elle est constituée de 376 acides aminés et sa masse moléculaire est de 46 kDa. Sa structure physico-chimique est proche de celle de l'apo AI et son rôle physiologique est mal connu.

### ■ *Apolipoprotéine AV*

L'apo AV a été découverte très récemment. Le gène codant l'apo AV est situé sur le chromosome 11 dans le « cluster » des gènes AI/CIII/AIV/AV. L'apo AV est synthétisée exclusivement par le foie. Constituée de 343 acides aminés, elle a une masse moléculaire de 39 kDa. Dans la circulation sanguine, l'apo AV est associée aux VLDL, aux chylomicrons et aux HDL. Sa concentration plasmatique, très faible par rapport aux autres apolipoprotéines, est d'environ 0,1 à 0,2 mg/L. Actuellement, on lui attribue un rôle dans le contrôle de la triglycéridémie : la concentration en apo AV est inversement proportionnelle à la concentration en triglycérides circulants. Le mécanisme d'action de l'apo AV sur l'homéostasie des triglycérides n'est pas élucidé, mais des arguments sont en faveur d'une diminution de la production hépatique des TG-VLDL et d'une augmentation de leur clairance hépatique.

### ■ *Apolipoprotéines B*

L'apo B est le constituant protéique majeur des lipoprotéines de basse densité. Sa concentration plasmatique est de 0,7 à 1 g/L environ et son augmentation est associée à un risque élevé d'athérosclérose. La synthèse d'apo B est nécessaire à la sécrétion dans le plasma des lipoprotéines riches en triglycérides d'origine intestinale et hépatique. L'association entre l'apo B et les lipides synthétisés se fait dans la lumière du réticulum endoplasmique, grâce à une enzyme, la *microsomal triglyceride transfer protein* (MTP), à la frontière entre le réticulum endoplasmique lisse, lieu de synthèse des lipides et le réticulum endoplasmique rugueux, lieu de synthèse de l'apo B. L'association lipides-apolipoprotéine est beaucoup plus étroite pour l'apo B que pour les autres apolipoprotéines, ce qui explique que l'apo B fasse partie intégrante d'une particule lipoprotéique et qu'elle ne sera pas échangée avec une autre particule pendant toute sa durée de vie plasmatique.

L'apo B est présente sous deux formes dans le plasma : l'apo B100, de masse moléculaire 549 kDa (4 536 acides aminés), est produite par le foie et l'apo B48, de masse moléculaire 275 kDa (48 % de l'apo B100), est produite par l'intestin. L'apo B48 correspond à l'extrémité aminoterminale de l'apo B100. L'apo B100 et l'apo B48 sont les produits d'un même gène situé sur le chromosome 2. Leur ARN

messager est identique mais, dans l'intestin, une enzyme spécifique (la cytidine désaminase) introduit une substitution Cytidine → Uracile modifiant le codon 2153, qui devient un codon stop. L'apo B100 sera donc le marqueur des lipoprotéines d'origine hépatique tandis que l'apo B48 sera le marqueur des lipoprotéines d'origine intestinale. L'apo B100 possède près de son extrémité carboxy-terminale un site qui lui permet d'être reconnue par les récepteurs présents à la surface des cellules hépatiques et des cellules ayant besoin de cholestérol, récepteurs appelés « récepteurs des LDL » (lipoprotéines de basse densité). Ce site de liaison aux LDL récepteurs n'est pas présent dans l'apo B48.

### ■ *Apolipoprotéines C*

Les apo Cs sont des protéines de masse moléculaire inférieure à 10 kDa. Les gènes codant les apo CI et CII sont situés dans un même « cluster » avec l'apo E, sur le chromosome 19. Le gène codant l'apo CIII fait partie du « cluster » AI/AIV/AV/CIII. Le rôle physiologique de l'apo CI est mal connu. L'apo CII est indispensable à l'activité de la LPL qui hydrolyse les triglycérides plasmatiques pour permettre l'utilisation des acides gras par les tissus. L'apo CIII joue un rôle antagoniste de l'apo CII vis-à-vis de la LPL et inhibe la liaison des lipoprotéines de basse densité aux récepteurs hépatiques. Les apo Cs sont facilement échangeables entre les lipoprotéines. Les apo CI et CIII sont souvent associées à l'apo CII dans les lipoprotéines de basse densité et dans les lipoprotéines de haute densité.

### ■ *Apolipoprotéine E*

Dans un plasma normolipémique, l'apo E est également répartie entre les lipoprotéines de haute et de basse densité. Elle représente 10 à 20 % de la masse des protéines des VLDL et 1 à 2 % des protéines des HDL. Sa concentration plasmatique est d'environ 0,04 g/L. L'apo E est constituée de 299 acides aminés et a une masse moléculaire de 34 kDa. Son gène fait partie du « cluster » E/CI/CII. L'apo E joue un grand rôle dans la reconnaissance des lipoprotéines par les cellules. Deux types de récepteurs reconnaissent des séquences spécifiques sur l'apo E :

- des récepteurs essentiellement hépatiques, spécifiques de l'apo E, qui captent les lipoprotéines d'origine intestinale contenant de l'apo E. Ces récepteurs sont appelés « LRP » (pour « *LDL-receptor related protein* ») ou récepteurs des chylomicrons résiduels ;
- les récepteurs des LDL qui reconnaissent l'apo B, reconnaissent aussi l'apo E. On les appelle aussi récepteurs B, E. Comme nous le verrons, ils sont présents sur la plupart des cellules de l'organisme et régulés par le contenu cellulaire en cholestérol.

Différents variants de l'apo E sont présents dans les populations humaines. Ces variants ont des affinités différentes pour le LDL récepteur. L'apo E est aussi présente dans le liquide céphalorachidien et semble jouer un rôle majeur dans le métabolisme lipidique du cerveau.

### ■ *Apolipoprotéine (a)*

L'apo (a) est une glycoprotéine présente chez certains individus, en quantité très variable d'un sujet à l'autre. Elle peut être libre dans le plasma ou associée par un pont disulfure à l'apo B dans des lipoprotéines appelées Lp(a) (*fig.* 4). Sa masse

moléculaire est variable suivant les individus (280 à 800 kDa) et sa concentration plasmatique est inversement proportionnelle à sa taille. Cette variabilité d'origine génétique est due à l'existence d'une séquence répétée dans la séquence primaire de l'apo (a). L'apo (a) présente une similitude structurale très forte avec le plasminogène et il est vraisemblable que cette structure lui permet d'intervenir dans les mécanismes de thrombose par une action antifibrinolytique. La présence d'une concentration élevée de Lp(a) est associée à un risque élevé d'athérosclérose, mais son rôle physiopathologique est inconnu.

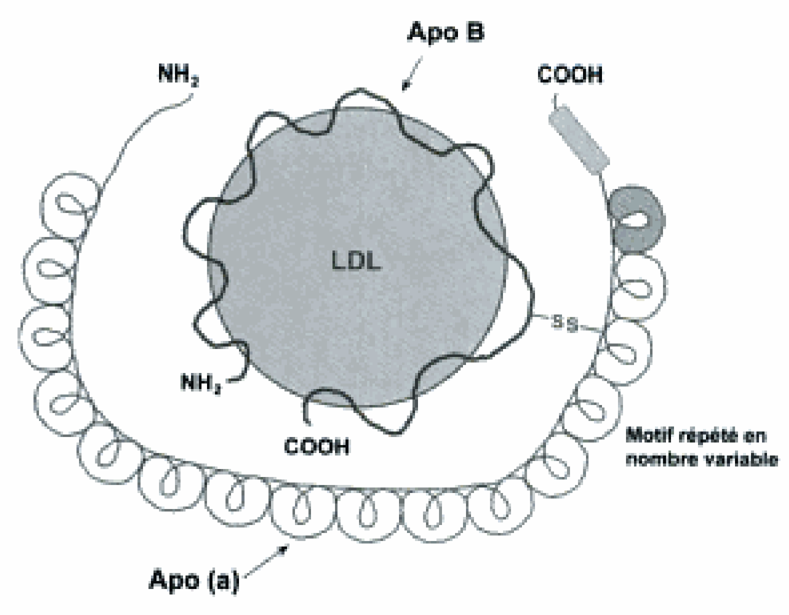



**Figure 4.** Structure de la Lp(a) : lipoprotéine composée d'une LDL avec, comme apolipoprotéine principale, l'apo B, associée par un pont disulfure à l'apo (a), protéine de taille variable ayant un motif commun avec le plasminogène. Ce motif est répété un nombre variable de fois suivant les individus

### b) Rôle des apolipoprotéines

Parmi les fonctions des apolipoprotéines, le rôle de structure est fondamental. Il permet la cohésion des complexes lipides-protéines et leur solubilisation en milieu aqueux. Les associations lipides-protéines ont lieu dès l'étape de biosynthèse, à la limite du réticulum endoplasmique rugueux et du réticulum endoplasmique lisse. Elles sont favorisées par la nature hydrophobe de nombreuses régions des apolipoprotéines. Dans le cas de l'apo B, ces associations hydrophobes sur de grandes longueurs sont très stables et l'apo B fera partie intégrante de la lipoprotéine sécrétée jusqu'à son catabolisme final dans les lysosomes d'une cellule. Dans la structure secondaire des autres apolipoprotéines, on trouve en général plusieurs régions organisées en α-hélice amphiphile comportant une phase apolaire au contact des lipides transportés et une phase polaire au contact du compartiment plasmatique. Ces α-hélices ont une forte affinité pour les phospholipides auxquels elles s'associent pour donner des lipoprotéines de sécrétion discoïdales très stables. Lorsque ces lipoprotéines se chargent en lipides (TG, CE), elles deviennent globulaires et l'association lipides-apolipoprotéines est moins stable (d'un point de vue thermodynamique), ce qui permet les échanges protéiques entre les lipoprotéines. Les apolipoprotéines ont aussi un rôle d'activation de certaines enzymes. Des apolipoprotéines peuvent activer la LCAT (*fig.* 3). Cette estérification du cholestérol

conduit à des modifications structurales des lipoprotéines, permet des échanges de lipides avec les lipoprotéines de basse densité et rend la lipoprotéine disponible comme accepteur de cholestérol cellulaire non estérifié. *In vivo*, le principal activateur de la LCAT semble être l'apolipoprotéine AI mais, *in vitro*, les apo CI, CII, CIII, D et AIV sont aussi des activateurs de la LCAT (ce qui est explicable par des analogies structurales). Une autre enzyme plasmatique activée par l'apo CII est la lipoprotéine lipase ou LPL. Cette enzyme n'est pas liée aux lipoprotéines, mais elle est associée aux membranes plasmiques des cellules endothéliales des capillaires par des chaînes oligosaccharidiques. La LPL hydrolyse les TG des lipoprotéines au niveau des tissus (*fig.* 5). L'apo CII est l'activateur indispensable de la LPL mais seul son déficit total entraîne une inactivation de l'enzyme. L'apo CIII a un effet inhibiteur de la LPL et le rapport apo CII-apo CIII joue un rôle majeur dans la régulation de la lipolyse plasmatique des TG. L'apo AV serait un activateur de la LPL.

Action de la lipoprotéine lipase (LPL)

$$\begin{array}{lcl} CH_2-O-CO-R_1 & & CH_2-OH \\ | & & | \\ CH-O-CO-R_2 & \xrightarrow[CII]{LPL} & CH-O-CO-R_2 \\ | & & | \\ CH_2-O-CO-R_3 & & CH_2-OH \\ & & + R_1-COOH \\ & & + R_3-COOH \end{array}$$

**Figure 5.** Mécanisme d'action de la lipoprotéine lipase (LPL). $R_1$—COOH, $R_2$—COOH et $R_3$—COOH sont des acides gras qui peuvent être identiques ou différents

Les apolipoprotéines ont un rôle dans la reconnaissance des lipoprotéines par les cellules. La source des lipides de l'organisme est, comme nous l'avons déjà vu, d'origine alimentaire et d'origine endogène (hépatique). Les tissus extra-hépatiques, bien que capables de synthétiser le cholestérol et certains autres lipides, reçoivent ces lipides par l'intermédiaire des lipoprotéines. De plus les lipoprotéines peuvent capter le cholestérol cellulaire en excès, c'est ce qu'on appelle l'efflux, première étape du transport inverse du cholestérol. L'interaction lipoprotéine-cellules et les échanges de lipides se font *in vivo* en partie par la voie de récepteurs spécifiques reconnaissant les apolipoprotéines associées aux lipides des lipoprotéines. Ces récepteurs jouent un rôle majeur dans le métabolisme des lipoprotéines plasmatiques.

Dans l'ensemble de ces processus, il est rare qu'une apolipoprotéine joue un rôle de façon isolée. Pour une apolipoprotéine donnée, la présence des autres apolipoprotéines et des lipides va déterminer à un instant donné sa place dans les lipoprotéines et par là même son rôle métabolique.

## 3. Enzymes et protéines de transfert des lipides

Certaines enzymes (*fig.* 3) et des protéines de transfert des lipides (*fig.* 6) font partie intégrante des lipoprotéines plasmatiques et jouent un rôle capital dans leur métabolisme :

- la LCAT (lécithine-cholestérol-acyltransférase) permet l'estérification du cholestérol plasmatique par transfert d'un acide gras d'un phospholipide. La LCAT est associée aux lipoprotéines de haute densité et y trouve directement ses substrats parmi les lipides de surface. Les esters de cholestérol formés, hydrophobes, gagnent le cœur de la lipoprotéine ;
- la CETP (cholestérol ester-transfert-protéine) ou protéine de transfert du cholestérol estérifié permet, au cours de la lipolyse des triglycérides des lipoprotéines, l'échange entre des esters de cholestérol des HDL et des triglycérides des lipoprotéines de basse densité ;
- la PLTP (phospholipide-transfert-protéine) permet des échanges de phospholipides entre les lipoprotéines ou entre les cellules et les lipoprotéines ;
- les enzymes comme la paraoxonase permettent aux lipoprotéines de haute densité de protéger de l'oxydation les lipoprotéines de basse densité.

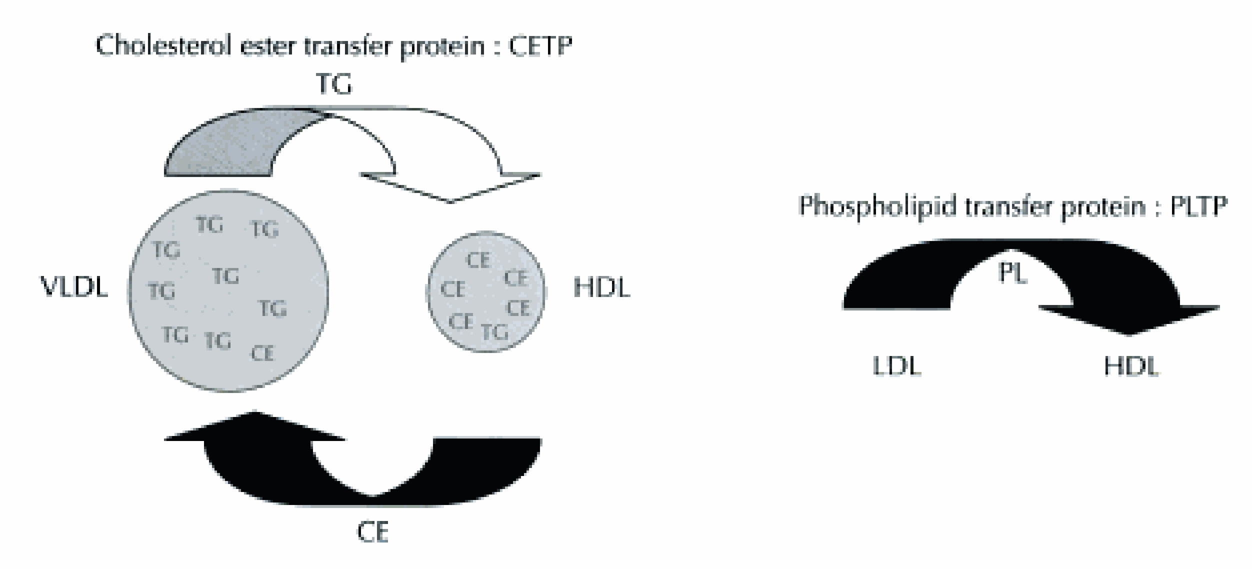



**Figure 6.** Les protéines de transfert des lipides associées aux lipoprotéines plasmatiques

## B. Classification des lipoprotéines

L'hétérogénéité des lipoprotéines et les modifications constantes auxquelles elles sont soumises rendent difficile leur classification. Les différents critères utilisés pour les classer sont leur composition en apolipoprotéines ou leurs propriétés physico-chimiques. La classification la plus utilisée est fondée sur la densité. Le *tableau* 2 permet une rapide comparaison entre les différentes classifications. Cependant, des lipoprotéines séparées par une technique ne sont jamais identiques à celles séparées par une autre technique.

### 1. Classification en fonction de la densité

Suivant leur composition lipidique et protéique, les lipoprotéines ont une densité différente. Plus légères que les protéines sériques à cause de la présence des lipides, on peut les isoler par ultracentrifugation de flottation. La répartition suivant le spectre de densité est discontinue, elle varie suivant l'état physiologique du sujet. On distingue en général (*tab. 2 et 3*) :

### a) Chylomicrons

Ce sont de très grosses particules de densité inférieure à 0,94 qui flottent à la densité saline du plasma (1,006). Leur origine est intestinale et on ne les retrouve dans la circulation qu'après un repas riche en graisses. Ils sont très riches en triglycérides (90 % des lipides) et ne contiennent que 2 à 3 % de protéines, essentiellement de l'apo B48 mais aussi des apo AI, AIV, AV, CI, CII et CIII.

### b) Lipoprotéines de très basse densité

On les appelle VLDL (*very low density lipoproteins*). De densité comprise entre 0,94 et 1,006, elles sont abondantes dans la circulation quelques heures après un repas. Leur production est essentiellement hépatique. Les VLDL permettent la sécrétion des lipides d'origine endogène synthétisés par le foie. Les VLDL sont de taille inférieure aux chylomicrons. Les triglycérides ne représentent plus que 50 % des lipides des VLDL. Les protéines représentent 10 % de leur masse totale et sont constituées par une molécule d'apo B100 d'origine hépatique, des apo AV, E, CI, CII et CIII.

### c) Lipoprotéines de basse densité

Les LDL (*low density lipoproteins*) ont une densité comprise entre 1,006 et 1,063. Très riches en cholestérol (60 à 70 % des lipides) elles sont aussi plus riches en protéines (25 % de leur masse). Plus elles sont riches en cholestérol, plus leur densité est élevée. Comme les VLDL qui sont leur précurseur, chaque LDL contient une molécule d'apo B100 et éventuellement des apo CI, CII, CIII et E en faible quantité. Les IDL (ou les LDL1) sont une sous-fraction des LDL de densité comprise entre 1,006 et 1,019. Habituellement absentes chez un sujet normolipémique à jeun, elles sont riches en cholestérol, en triglycérides et en apo E. Elles constituent des intermédiaires métaboliques dans le processus de lipolyse plasmatique des VLDL.

### d) Lipoprotéines de haute densité

Les HDL (*high density lipoproteins*) ont une densité comprise entre 1,063 et 1,21. Riches en cholestérol (40 % des lipides) et en phospholipides (50 % des lipides), elles sont composées pour moitié de protéines (50 % de leur masse totale) qui sont essentiellement les apo AI et AII mais aussi, en moindre quantité, les apolipoprotéines AIV, AV, CI, CII, CIII, E, D…

Deux sous-fractions principales de HDL existent dans le plasma : les $HDL_2$, de densité comprise entre 1,063 et 1,125, et les $HDL_3$, de densité comprise entre 1,125 et 1,21. Les HDL sont les lipoprotéines les plus hétérogènes du plasma et sont en perpétuel remodelage. Il existe également de nombreuses sous-fractions présentes en très faible quantité mais très importantes pour le métabolisme des lipoprotéines.

La LCAT et des protéines de transfert des lipides sont présentes sur les HDL qui sont le seul lieu d'estérification du cholestérol plasmatique. Une partie du cholestérol estérifié est ensuite transférée aux autres lipoprotéines par la CETP.

### e) Lp(a)

Présente seulement chez certains individus, sa densité est comprise entre celle des LDL et celle des HDL. Elle contient essentiellement deux apolipoprotéines, l'apo (a) et l'apo B (*fig.* 4).

## 2. Classification en fonction de la taille et de la masse moléculaire des lipoprotéines

En première approximation, il existe une relation inverse entre la taille et la densité des lipoprotéines (*tab.* 2). Les plus grosses lipoprotéines, les chylomicrons, ont un diamètre qui peut atteindre 1 µm, soit le dixième d'un lymphocyte circulant. À l'inverse, les HDL ont une taille comprise entre 6 et 10 nm. Cependant, la relation taille-densité n'est pas toujours observée. Ainsi la Lp(a), dont la densité est supérieure aux LDL, a une taille comprise entre celle des VLDL et des LDL.

## 3. Classification en fonction de la mobilité électrophorétique

En milieu alcalin, les lipoprotéines plasmatiques sont chargées négativement et peuvent être séparées par électrophorèse sur acétate de cellulose ou gel d'agarose. Par analogie avec les protéines sériques, les lipoprotéines ainsi séparées peuvent être classées en α-lipoprotéines correspondant aux HDL, en β-lipoprotéines correspondant aux LDL et en pré-β-lipoprotéines correspondant aux VLDL. Certaines HDL naissantes, très denses, ont une mobilité de pré-β-lipoprotéines. Les chylomicrons ne sont pas chargés et ne migrent donc pas en électrophorèse (*tab.* 2).

**Tableau 2.** Principales propriétés des lipoprotéines séparées en fonction de leur densité

| | Densité | Mobilité électrophorétique | Diamètre (nm) | Masse moléculaire moyenne (kDa) | Principales apolipoprotéines |
|---|---|---|---|---|---|
| Chylomicrons | < 0,94 | origine | 100-1 000 | 1 000 000 | B48 |
| VLDL | 0,94-1,006 | pré-β | 30-80 | 7 500 | B100, C |
| IDL | 1,006-1,019 | pré-β lente | 25-35 | 4 000 | B100, E |
| LDL | 1,019-1,063 | β | 15-25 | 2 000 | B100 |
| $HDL_2$ | 1,063-1,125 | α | 9-14 | 400 | AI, AII |
| $HDL_3$ | 1,125-1,210 | α | 6-10 | 200 | AI, AII |

La mobilité électrophorétique est mesurée sur acétate de cellulose à pH 8,2.
VLDL, *very low density lipoproteins* ; IDL, *intermediary density lipoproteins* ; LDL, *low density lipoproteins* ; HDL, *high density lipoproteins*.

## 4. Classification en fonction de la composition en apolipoprotéines

Les lipoprotéines simples ne contiennent qu'une seule apolipoprotéine, par exemple, la LpAI, la LpB, la LpE. Les lipoprotéines complexes contiennent deux ou plusieurs apolipoprotéines et sont désignées par l'ensemble des apolipoprotéines qui les composent, par exemple, LpB:E, LpAI:AII, LpB:CIII:CI:E…

## 5. Autres classifications

Différents réactifs peuvent aussi être utilisés pour former des complexes insolubles avec certaines lipoprotéines et faciliter leur séparation. Les plus utilisés sont l'héparine, le sulfate de dextran ou l'acide phosphotungstique en présence de sels de magnésium, manganèse ou calcium. Ces méthodes très simples sont très utili-

sées pour précipiter les lipoprotéines de basse densité et permettre le dosage des lipides dans les fractions à des fins diagnostiques.

## C. Composition des lipoprotéines

Le *tableau 3* résume la composition lipidique et protéique des lipoprotéines. Ce sont des valeurs moyennes pour un individu normolipémique à jeun (excepté pour les chylomicrons qui ne sont présents qu'en période postprandiale). Ces valeurs varient d'un individu à l'autre et en fonction de l'alimentation du sujet.

**Tableau 3.** Composition schématique des lipoprotéines plasmatiques humaines

| | Chylomicrons | VLDL | LDL | HDL |
|---|---|---|---|---|
| Densité | < 0,94 | 0,94-1,006 | 1,006-1,063 | 1,063-1,210 |
| % protéines | 2 % | 10 % | 25 % | 50 % |
| % lipides | 98 % | 90 % | 75 % | 50 % |
| Lipides majeurs | TG | TG | C, PL | PL, C |
| Apolipoprotéines majeures | B48, C, AI, AIV, AV, E | B100, C, AV, E | B100 | AI, AII, AV |
| Enzymes | | | | LCAT, CETP |

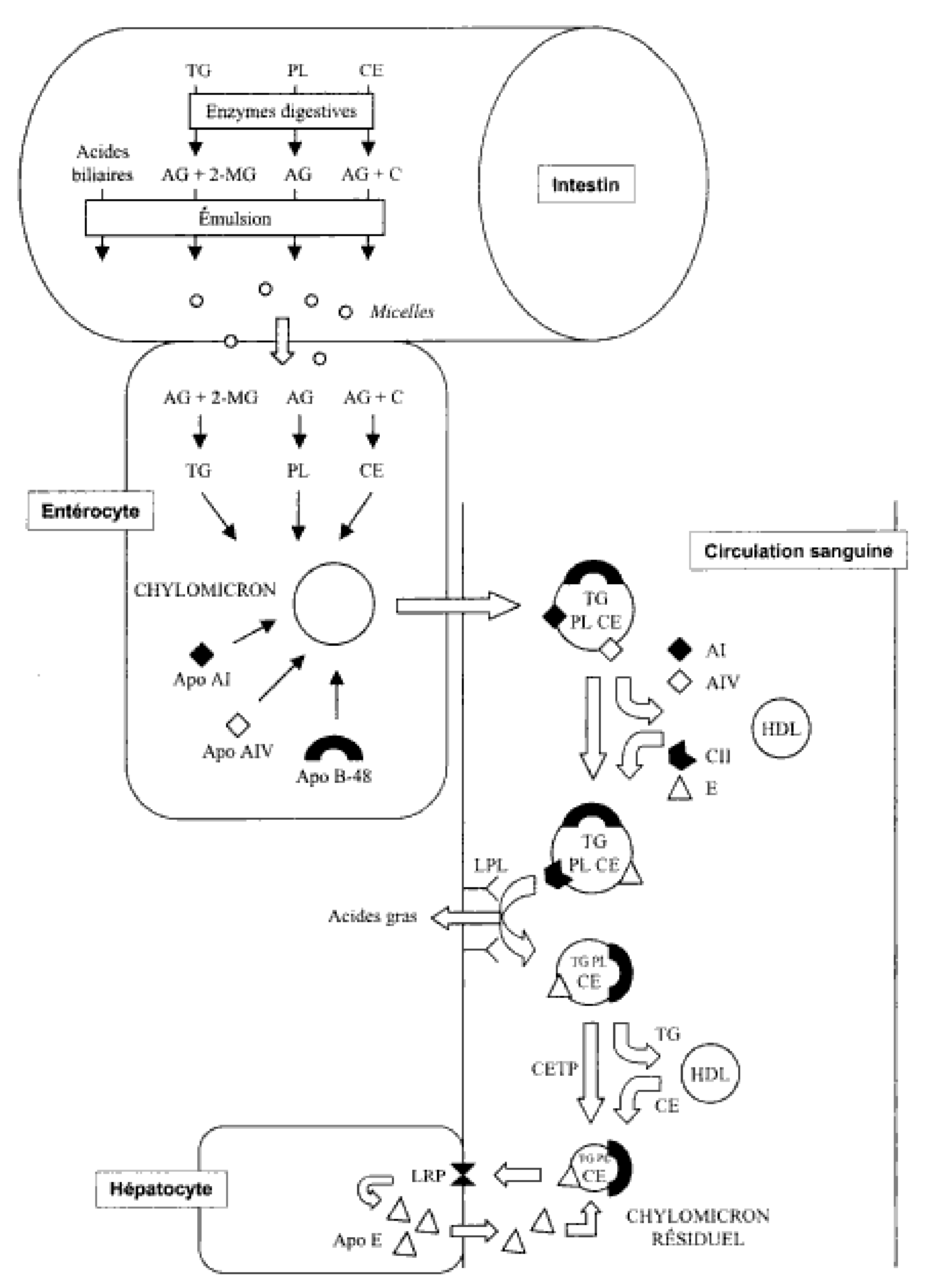
Il s'agit d'une composition indicative, en pourcentage de la masse de chaque composant.
À titre indicatif, la composition en mole/mole de lipoprotéine d'une VLDL est la suivante : cholestérol, 2 180 moles ; phospholipides, 3 210 moles ; triglycérides, 7 000 moles ; esters de cholestérol, 1 980 moles ; apo B100, 1 mole ; apo CI, 5 moles ; apo CII, 13 moles ; apo CIII, 37 moles ; apo E 6 moles.
TG, triglycérides ; C : cholestérol ; PL, phospholipides ; VLDL, *very low density lipoproteins* ; LDL, *low density lipoproteins* ; HDL, *high density lipoproteins.*

# II. Métabolisme des lipoprotéines

## A. Chylomicrons

### 1. Formation dans l'entérocyte

Les lipides d'origine alimentaire sont émulsifiés dans l'estomac puis dans l'intestin par les sels biliaires (*fig.* 7). Cette émulsion augmente leur réactivité vis-à-vis de la lipase pancréatique qui hydrolyse les liaisons ester en position 1 et 3 des triglycérides. Les phospholipides sont hydrolysés par des phospholipases A1 et A2 et les esters de cholestérol par une cholestérol estérase. Les 2-monoglycérides et les acides gras peuvent alors être captés par les entérocytes et être utilisés pour la synthèse des triglycérides qui forment l'essentiel du chylomicron sécrété. De même les entérocytes procèdent à une resynthèse de phospholipides et d'esters de cholestérol (à partir du cholestérol luminal d'origine alimentaire ou biliaire et dont les transporteurs entérocytaires ont très récemment été identifiés). Grâce à la MTP, l'apo B48 va s'associer aux phospholipides pour permettre la stabilisation de la lipoprotéine qui contiendra aussi le cholestérol et les autres apolipoprotéines syn-




C, cholestérol ; CE, cholestérol estérifié ; TG, triglycérides ; PL, phospholipides ; apo, apolipoprotéine ; AG, acide gras ; MG, monoglycéride.

**Figure 7.** Métabolisme des chylomicrons

thétisées dans l'intestin. La synthèse intestinale des chylomicrons débute très rapidement après un repas. Ces derniers sont alors sécrétés dans la lymphe et ils apparaissent dans la circulation quelques minutes après. Leur demi-vie plasmatique est très brève (20 à 30 minutes).

### 2. Métabolisme vasculaire

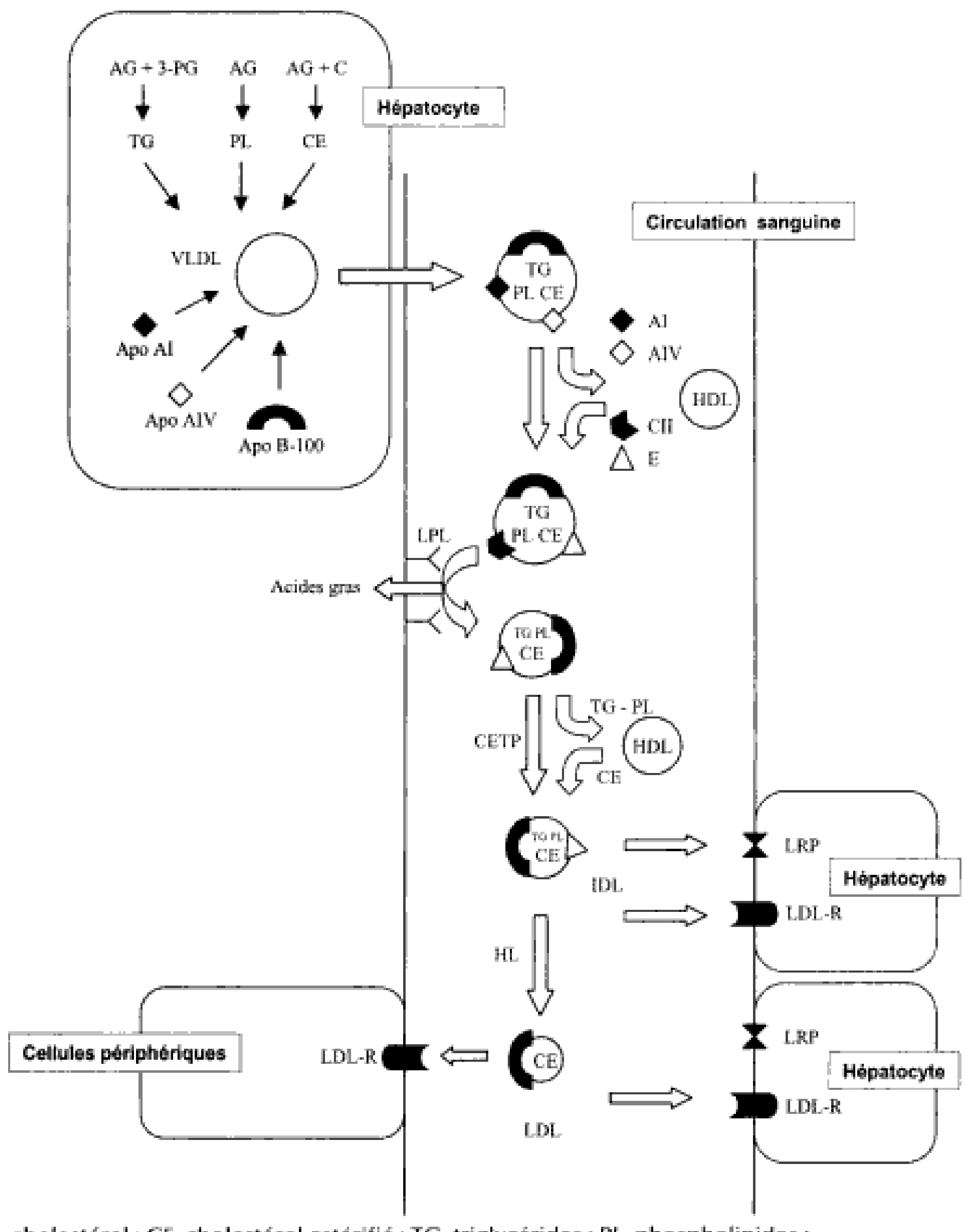
Après sécrétion dans le liquide interstitiel, les chylomicrons gagnent la circulation plasmatique et des apolipoprotéines C et E leur sont transférées en provenance des HDL tandis qu'ils cèdent leurs apo AI et AIV. L'apo CII permet aux chylomicrons d'être reconnus par la lipoprotéine lipase (LPL). Cette enzyme synthétisée par les adipocytes et les myocytes est fixée par des chaînes oligosaccharidiques à la membrane externe des cellules endothéliales des vaisseaux capillaires du tissu adipeux et du tissu musculaire. La LPL est libérée dans la circulation générale après une injection d'héparine, propriété qui rendra possible son dosage. Son expression est contrôlée par l'insuline, elle est donc abondante en période postprandiale. La LPL activée par l'apo CII hydrolyse les triglycérides. Les acides gras et le glycérol libérés sont captés par les tissus et utilisés à des fins énergétiques.

### 3. Captation par les récepteurs hépatiques

Lors de la lipolyse intravasculaire, l'hydrolyse des triglycérides s'accompagne d'une forte réduction de la taille du chylomicron. Des phospholipides de surface et une partie des apo C et AI des chylomicrons sont transférés aux HDL. Les HDL vont en outre échanger des esters de cholestérol avec des triglycérides des chylomicrons. Les chylomicrons résiduels enrichis en esters de cholestérol sont constitués d'apo B48, d'apo E et de lipides. Ils seront captés par les hépatocytes par l'intermédiaire de récepteurs reconnaissant l'apo E. Le récepteur hépatique des « chylomicrons résiduels » sert au catabolisme des chylomicrons d'origine intestinale partiellement métabolisés par la lipoprotéine lipase. Ce récepteur présente des analogies structurales avec le LDL récepteur et a été dénommé « LRP » (*LDL-receptor related protein*). Ce récepteur n'est pas spécifique des « chylomicrons résiduels », il reconnaît aussi l'alpha-2-macroglobuline plasmatique et d'autres ligands. Il fonctionne par endocytose. Son activité sur les lipoprotéines est augmentée par la sécrétion hépatique d'apo E et recapture de cette apo E par les chylomicrons. L'expression du LRP n'est pas régulée par le cholestérol cellulaire. Après internalisation, les « chylomicrons résiduels » seront dégradés par les cellules.

## B. VLDL

Les VLDL sont synthétisées par l'hépatocyte et sécrétées dans la circulation sanguine (*fig. 8*). Les triglycérides des VLDL sont synthétisés à partir des acides gras et du 3-phosphoglycerol. La synthèse des acides gras à partir de l'acétyl CoA est favorisée par l'insuline en période postprandiale. Au contraire, en absence d'insuline, l'activation de la triglycéride lipase du tissu adipeux provoque un afflux d'acides gras vers le foie. L'apo B100, protéine de structure des VLDL hépatiques, est synthétisée dans l'hépatocyte. La régulation de la synthèse du cholestérol et des triglycérides hépatiques est capitale pour la sécrétion des VLDL. En effet, si la synthèse de lipides est insuffisante, l'apo B sera dégradée et les VLDL ne seront pas sécrétées. De même, la MTP est indispensable à l'assemblage et à la sécrétion des VLDL par le foie. Dans le réticulum endoplasmique de la cellule, la MTP se lie aux molécules d'apo B au cours de leur synthèse et les charge de lipides pour former les lipopro-




C, cholestérol ; CE, cholestérol estérifié ; TG, triglycérides ; PL, phospholipides ; apo, apolipoprotéine ; AG, acide gras ; MG, monoglycéride ; 3-PG : 3-phosphoglycérol.

**Figure 8.** Métabolisme des VLDL

téines matures qui seront sécrétées. Le déficit en MTP conduit à une a-bétalipoprotéinémie. La MTP est une cible potentielle pour le traitement des dyslipidémies.
Les VLDL sont sécrétées quelques heures après un repas, lorsque l'insulinémie a diminué. Dans le compartiment vasculaire, le métabolisme des VLDL est similaire à celui des chylomicrons bien que plus lent. La demi-vie des VLDL est d'environ 4 heures. Elles reçoivent des apo C et E par transfert à partir des HDL. Comme pour les chylomicrons, le catabolisme des TG des VLDL est assuré par la LPL acti-

vée par l'apo CII. Les acides gras sont délivrés aux tissus et les apo C et les phospholipides transférés aux HDL. Pendant la lipolyse vasculaire, les VLDL reçoivent des esters de cholestérol en provenance des HDL auxquelles elles fournissent des triglycérides. Ces transferts sont catalysés par la CETP (*fig.* 5).
Les lipoprotéines de densité intermédiaire qui en résultent et que l'on appelle IDL (*intermediary density lipoproteins*) sont riches en esters de cholestérol et en apo E. Elles ont une très forte affinité pour les récepteurs hépatiques de l'apo E et donc la majorité des IDL sont internalisées très rapidement par les récepteurs hépatiques, LRP et LDL récepteur, puis dégradées. Le mécanisme moléculaire d'action du LDL récepteur sera détaillé avec le métabolisme des LDL.
D'autres récepteurs des VLDL ont été décrits au niveau des tissus périphériques. Ils reconnaissent aussi l'apo E et pourraient jouer un rôle dans le métabolisme des VLDL.

## C. LDL

### 1. Métabolisme par le LDL récepteur

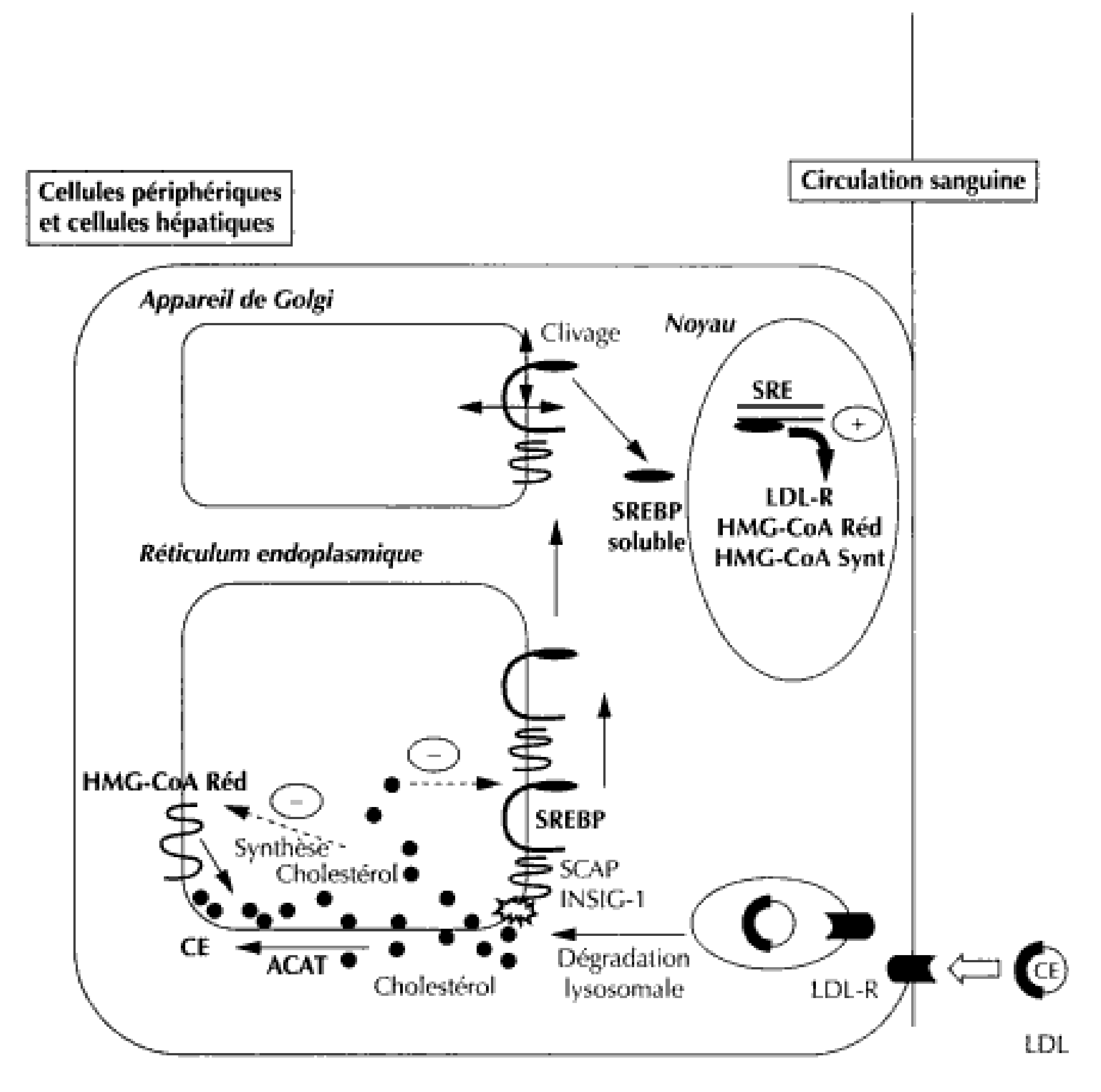
Après lipolyse des VLDL en IDL, une partie des IDL est transformée dans la circulation en LDL par action de la lipase hépatique (HL). Les LDL sont des lipoprotéines plus petites, riches en esters de cholestérol et pauvres en apo E. L'apo B100 reste liée à la particule lipidique depuis sa sécrétion hépatique sous forme de VLDL, jusqu'à sa dégradation finale. Les LDL ont une demi-vie de plusieurs jours, leur apo B100 peut être reconnue par tous les LDL récepteurs présents sur les tissus. La durée de vie plus longue des LDL est due à leur faible contenu en apo E et à la moindre affinité des récepteurs LDL pour l'apo B que pour l'apo E. Les LDL sont internalisées par un mécanisme d'endocytose dans les cellules (*fig.* 9) et dégradées dans les lysosomes où les esters de cholestérol sont hydrolysés. Dans la cellule, le cholestérol contribue à l'architecture des membranes. En outre, dans les cellules spécialisées, le cholestérol est le précurseur de la synthèse des hormones stéroïdes ou des sels biliaires. L'augmentation de la concentration en cholestérol non estérifié dans les membranes cellulaires :

- stimule l'ACAT et l'estérification du cholestérol permettant son stockage ;
- inhibe sa propre synthèse en inhibant l'activité de l'enzyme clé l'HMG-CoA réductase.

Il existe aussi un autre niveau de régulation par le cholestérol que l'on appelle « la voie SREBP » (*fig.* 9), qui permet la régulation du taux d'expression des gènes codant l'HMGCoA synthase, l'HMG-CoA réductase et les récepteurs LDL :

- quand la concentration intracellulaire en cholestérol est importante, SREBP (*sterol response element binding protein*) est séquestrée dans la membrane du réticulum endoplasmique par interaction avec SCAP (*SREBP-cleavage activating protein*), qui interagit elle-même avec INSIG-1 (*insulin-induced gene-1*) ;
- quand la concentration en cholestérol devient insuffisante, la voie de maturation de SREBP est activée. SCAP perd son affinité pour INSIG-1 et assure le transfert de SREBP vers l'appareil de Golgi. Deux hydrolyses successives libéreront SREBP mature soluble, qui migrera dans le noyau où elle joue le rôle de facteur de trans-

cription en se fixant sur des éléments de réponse aux stérols ou SRE (*sterol responsive element*) et induisant alors l'expression de plusieurs gènes codant des protéines impliquées dans la synthèse endogène du cholestérol (gènes codant l'HMG-CoA synthase et l'HMG-CoA réductase) et dans l'entrée du cholestérol dans la cellule (gène codant le récepteur LDL).




SREBP, *sterol response element binding protein* ; SRE, *sterol response element* (séquence nucléotidique de l'ADN située sur le promoteur de certains gènes et capable de reconnaître spécifiquement la SREBP) ; SCAP, *SREBP-cleavage activating protein* (protéine permettant le trafic de SREBP du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi quand les concentrations intracellulaires en cholestérol sont faibles) ; INSIG-1, *insulin-induced gene-1* (protéine de rétention de SCAP dans le RE quand les concentrations intracellulaires de cholestérol sont importantes) ; CE : cholestérol estérifié ; LDL-R, LDL récepteur ; ACAT, acylCoA-cholestérol-acyltransférase (enzyme d'estérification du cholestérol).

**Figure 9.** Métabolisme des LDL et régulation cellulaire de l'homéostasie du cholestérol par la voie SREBP

La biosynthèse des récepteurs LDL est aussi contrôlée par certaines hormones (stimulation par la thyroxine et les œstrogènes).

Ces récepteurs servent à la fois à l'apport de cholestérol aux tissus extra-hépatiques et au catabolisme des lipoprotéines par le foie. La régulation des récepteurs LDL par le cholestérol intracellulaire est un facteur déterminant de la cholestérolémie. L'absence ou le déficit génétique en récepteurs LDL conduit à une accumulation des LDL caractéristique de l'hypercholestérolémie familiale.

### 2. Oxydation des LDL et catabolisme par les « scavenger récepteurs »

Sous l'influence de différents facteurs, les LDL sont susceptibles d'être oxydées. L'oxydation a lieu à la fois sur l'apo B et sur les lipides. Ce phénomène d'oxydation se produit dans la circulation sanguine, ou lorsque les LDL circulantes traversent l'endothélium vasculaire lésé et se trouvent au contact des cellules de l'espace sous-endothélial (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, monocytes-macrophages). Contrairement aux LDL natives, elles ne sont plus reconnues par le récepteur LDL mais par des récepteurs dits « éboueurs » ou « *scavenger* » présents à la surface des macrophages et des cellules musculaires lisses. Ces récepteurs ne sont pas régulés par le contenu intracellulaire en cholestérol et par conséquent les cellules se chargent en cholestérol indépendamment de leurs besoins. L'accumulation de cholestérol dans les macrophages conduit à la formation des cellules spumeuses, caractéristiques de la plaque d'athérome.

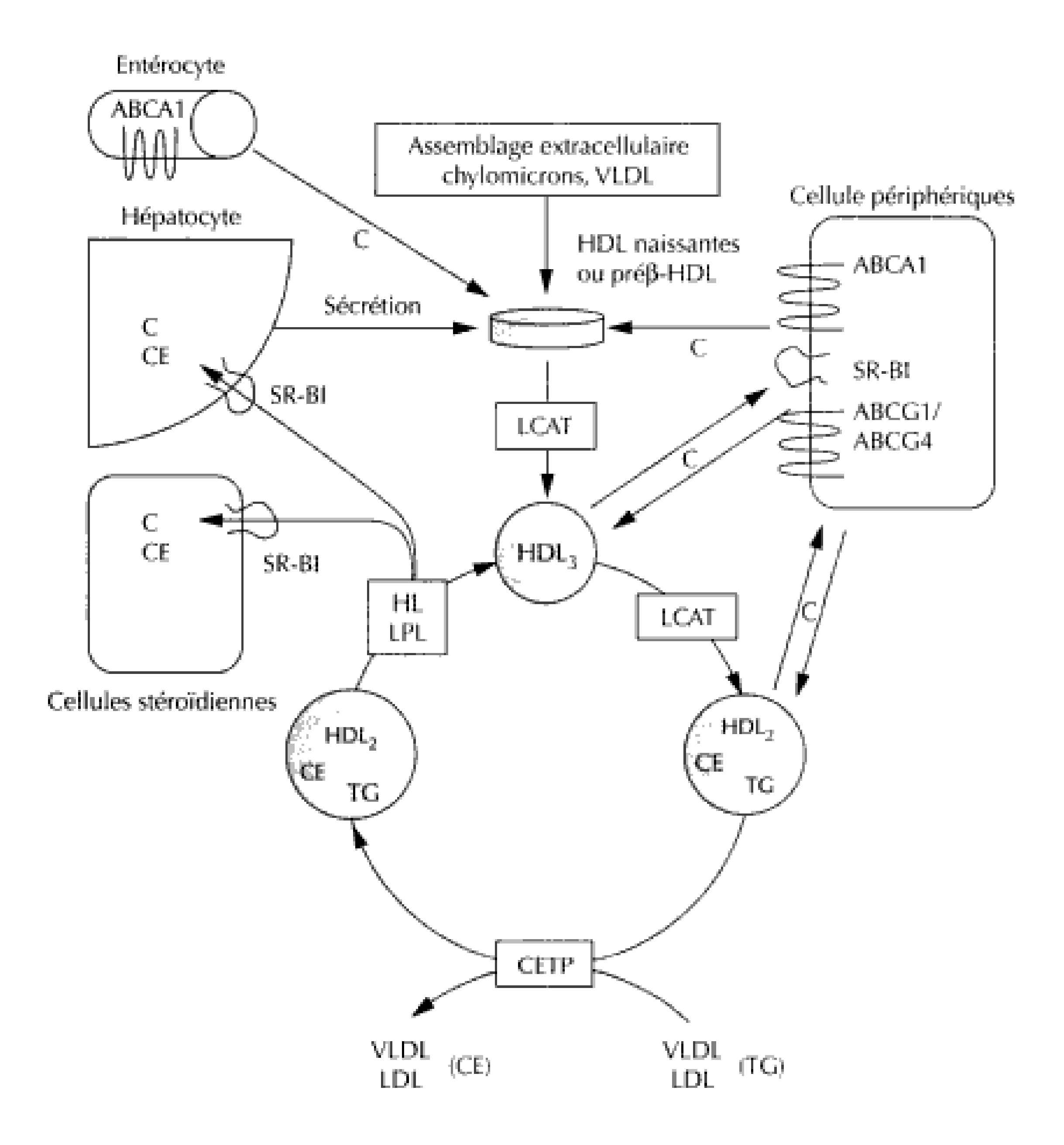
## D. HDL et transport inverse du cholestérol

### 1. Formation des HDL et remodelage vasculaire

Les HDL jouent un rôle central dans le métabolisme plasmatique des lipoprotéines. Elles peuvent être considérées comme la plaque tournante des échanges de lipides entre lipoprotéines, et entre lipoprotéines et cellules (*fig. 10*). Leur hétérogénéité est très grande.
Les HDL naissantes sont synthétisées essentiellement dans le foie. Des travaux récents suggèrent aussi une part non négligeable de la production des HDL par l'intestin par un mécanisme d'efflux de cholestérol vers de l'apo AI libre circulante. Les HDL néosynthétisées sont discoïdales et constituées de phospholipides, de cholestérol, d'apo E, AI et C et de LCAT. Elles sont d'excellents accepteurs du cholestérol cellulaire. Les HDL peuvent aussi provenir du remodelage intravasculaire des autres lipoprotéines. En effet, dans le plasma, des apo C, AI et E et des lipides de la couche superficielle des chylomicrons et des VLDL (après action de la LPL) contribuent à former les HDL.
Dans la circulation, le cholestérol des HDL est estérifié par la LCAT activée par l'apo AI. Les esters ainsi formés migrent alors à l'intérieur de la lipoprotéine et conduisent à la formation des $HDL_3$ globulaires. Ces lipoprotéines sont de bons accepteurs pour le cholestérol cellulaire qui sera lui aussi rapidement estérifié par la LCAT dans les HDL. L'action de la CETP permet aux HDL de s'enrichir en triglycérides aux dépens du cholestérol estérifié. Tous ces échanges lipidiques vont contribuer à des modifications de structure des HDL, qui deviendront plus grosses et plus légères et qui seront appelées $HDL_2$.
Dans les capillaires hépatiques, les phospholipides et les triglycérides des $HDL_2$ sont hydrolysés par la lipase hépatique (HL). Des apo C et E et des phospholipides

s'éliminent de la couche périphérique. Les $HDL_2$ sont alors retransformées en $HDL_3$, ou captées par le foie, le rein ou les glandes surrénales. La PLTP joue un rôle important dans ce remodelage.

Le catabolisme des HDL est très complexe à cause des perpétuels remaniements, des transferts et des échanges avec les cellules et avec d'autres lipoprotéines. Il est donc difficile de préciser la durée de vie moyenne d'une HDL. Cependant, la demi-vie plasmatique des apo AI et AII est de quatre à six jours. Une grande partie de l'élimination de l'apo AI se fait par voie rénale.




C, cholestérol ; CE, cholestérol estérifié ; TG, triglycérides ; PL, phospholipides ; apo, apolipoprotéine ; SR-BI, *scavenger* récepteur de classe B type I (récepteur des HDL) ; ABCA1, *ATP-binding cassette 1* (transporteur ionique ayant un domaine de fixation de l'ATP et impliqué dans l'efflux de cholestérol cellulaire dépendant de l'apo AI) ; ABCG1, hémitransporteur de la famille des transporteurs ABC (en homodimère ou hétérodimère avec ABCG4, il est impliqué dans l'efflux de cholestérol cellulaire vers les HDL).

**Figure 10.** Métabolisme des HDL et transport inverse du cholestérol

### 2. Catabolisme hépatique des esters de cholestérol des HDL

Le seul site de catabolisme du cholestérol est le foie, où le cholestérol est transformé en acides et en sels biliaires. Nous avons vu qu'une partie du cholestérol alimentaire retournait au foie par l'intermédiaire des chylomicrons résiduels et du récepteur LRP. Dans la circulation grâce à la CETP, les chylomicrons s'étaient enrichis en esters de cholestérol provenant des HDL. Le même mécanisme a lieu avec les IDL. Les HDL peuvent donc diriger vers le foie des esters de cholestérol par la voie des récepteurs des lipoprotéines de basse densité. Il a récemment été montré qu'un récepteur hépatique appelé SR-BI (*scavenger* récepteur de classe B type I) pouvait transférer à l'hépatocyte des esters de cholestérol des HDL sans internalisation de la lipoprotéine. Ce mécanisme de captation sélective des esters de cholestérol, différent du mécanisme d'endocytose, nécessite de l'énergie car il suppose le transfert d'une molécule apolaire à travers la couche aqueuse présente entre la lipoprotéine et les cellules. Ce récepteur SR-BI reconnaît spécifiquement l'apo AI et libère dans la circulation des HDL moins riches en esters de cholestérol. Le cholestérol estérifié par la LCAT dans les HDL peut donc retourner au foie soit par les récepteurs de lipoprotéines de basse densité grâce à la CETP, soit directement par SR-BI.

### 3. Efflux du cholestérol cellulaire par les HDL

Les HDL, nous l'avons vu, sont les seules lipoprotéines capables de capter le cholestérol cellulaire et donc d'assurer le retour vers le foie du cholestérol de l'organisme. Ce mécanisme est capital au niveau du tissu artériel. En effet, l'accumulation de cholestérol estérifié dans certaines cellules comme les macrophages constitue un risque majeur de développement de la plaque d'athérome.
Au plan cellulaire, ce mécanisme peut être passif lorsque le gradient de cholestérol entre les membranes cellulaires et la surface des HDL est suffisant, cela implique une forte activité de la LCAT pour estérifier le cholestérol au fur et à mesure de son transfert.
Cependant, le passage du cholestérol vers les cellules peut être facilité par l'interaction directe des HDL avec des récepteurs membranaires. Le récepteur SR-BI pourrait jouer ce rôle, mais aussi l'hémitransporteur ABCG1 (de la famille des transporteurs à *ATP-binding cassette* [ABC]) en s'homodimérisant ou en s'hétérodimérisant avec ABCG4.
Une voie directe d'efflux de cholestérol vers l'apo AI non associée à des lipides a aussi été mise en évidence. Elle implique ABCA1 (autre transporteur de la famille des ABC) dont le déficit chez certains patients conduit à l'absence d'efflux de cholestérol cellulaire au niveau des tissus périphériques et à un effondrement des HDL plasmatiques (maladie de Tangier).

## III. Cibles thérapeutiques

Différentes voies du métabolisme des lipides et des lipoprotéines peuvent être des cibles thérapeutiques pour le traitement des dyslipidémies : voie d'entrée du cholestérol dans l'organisme, voie de synthèse des lipides endogènes, voies cataboliques vasculaires et cellulaires.
Les fibrates diminuent la concentration en triglycérides circulants par inhibition de leur synthèse hépatique et par activation de leur catabolisme *via* la LPL dans le

compartiment vasculaire. Leur mécanisme d'action passe par la régulation transcriptionnelle de l'expression de gènes *via* le récepteur nucléaire *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) alpha.
Les statines inhibent la synthèse du cholestérol endogène en agissant sur l'HMG-CoA réductase, enzyme clé dans la voie de biosynthèse du cholestérol. La diminution de la teneur en cholestérol dans la cellule hépatique conduit alors à l'augmentation de l'expression des récepteurs aux LDL, à la captation des lipoprotéines circulantes et à la diminution de la concentration en cholestérol circulant.
En plus de leurs effets hypolipidémiants, les fibrates et les statines exercent des effets dits pléiotropiques sur les composantes inflammatoires et vasculaires de l'athérogenèse, et diminuent ainsi le risque cardio-vasculaire chez l'homme.
Les résines agissent dans le tractus intestinal où elles captent le cholestérol d'origine alimentaire et biliaire, favorisant son élimination dans les fèces. L'inhibition du recyclage du cholestérol par le cycle entéro-hépatique favorise la conversion du cholestérol en acides biliaires dans le foie.
L'ézétimibe, molécule de découverte récente, est un inhibiteur de l'absorption intestinale du cholestérol. Il agirait sur les transporteurs membranaires de cholestérol présents à la surface de l'entérocyte.
L'action combinée de plusieurs molécules peut conduire à des effets additionnels voire synergiques sur les concentrations en lipides circulants. Un traitement par l'ézétimibe potentialise la diminution de la cholestérolémie induite par les statines.

# Conclusion

Le métabolisme des lipoprotéines plasmatiques est un phénomène complexe dépendant entre autres de l'apport de lipides alimentaires, de la synthèse hépatique et de l'utilisation des graisses du tissu adipeux. Certains systèmes sont redondants et l'organisme met tout en œuvre pour éviter la survenue de carences en lipides. Les dysfonctionnements du métabolisme des lipoprotéines conduiront essentiellement à des pathologies de surcharge. Les régulations hormonales agissent au niveau des synthèses endogènes de lipides, de la synthèse du récepteur LDL et au niveau du tissu adipeux. Il faut toujours avoir à l'esprit qu'il s'agit de systèmes dynamiques et que l'étude des lipides et des lipoprotéines plasmatiques à jeun ne pourra donner qu'une vision à un instant donné de ce métabolisme.

## L'essentiel de la question

Les lipoprotéines plasmatiques sont des complexes macromoléculaires assurant le transport des lipides en permettant leur solubilisation par des protéines spécifiques appelées apolipoprotéines.Les lipides (cholestérol, triglycérides et phospholipides) peuvent être d'origine alimentaire ou d'origine endogène (synthèse hépatique). Les lipoprotéines assurent l'apport des lipides aux cellules périphériques. Cependant, comme le cholestérol ne peut être catabolisé que par l'hépatocyte, elles doivent donc aussi assurer leur retour au foie.

Les apolipoprotéines jouent un rôle fondamental dans la structure des lipoprotéines. Elles sont aussi cofacteurs d'enzymes et de protéines de transfert transportées ou non par les lipoprotéines. Elles permettent l'interaction spécifique des lipoprotéines avec les cellules grâce à leur reconnaissance par des récepteurs cellulaires spécifiques, reconnaissance qui gouverne alors en partie leur métabolisme.
L'hétérogénéité des lipoprotéines et leur remaniement constant au cours de leur métabolisme rendent difficile leur classification. C'est la classification en fonction de leur densité qui est la plus utilisée. On distingue alors les chylomicrons, les VLDL, les LDL, les HDL et la Lp(a).
Les chylomicrons sont constitués de lipides alimentaires et sont sécrétés par l'entérocyte. Après une lipolyse partielle, les « chylomicrons résiduels » sont captés par le foie.
Le foie contribue à la formation des VLDL à partir des lipides alimentaires et endogènes. Les VLDL sécrétées dans la circulation sanguine vont subir une lipolyse et un échange de leurs triglycérides contre des esters de cholestérol venant des HDL. La cascade lipolytique va conduire aux IDL puis aux LDL.
Les LDL sont reconnues par toutes les cellules ayant besoin de cholestérol et exprimant le LDL récepteur. Si les LDL stagnent dans le lit vasculaire, elles peuvent alors subir des modifications telles que l'oxydation. Elles seront alors reconnues par d'autres récepteurs présents en particulier sur les macrophages ou les cellules musculaires lisses, ce qui conduit à la formation de cellules spumeuses.
Les HDL ont un rôle majeur dans les échanges de lipides et de protéines entre les lipoprotéines ainsi que dans l'efflux du cholestérol cellulaire. Elles assurent le retour du cholestérol de l'organisme vers le foie par un mécanisme appelé « transport inverse du cholestérol ».
Les lipoprotéines résultent donc d'un équilibre dynamique dépendant de l'apport alimentaire et des besoins de l'organisme. Elles subissent des remaniements permanents résultant d'échanges et de transferts de lipides et de protéines par interaction entre elles et avec les cellules.

***Pour en savoir plus***


- Perret B., Milne R., Collet X. Transport des lipides : fonction des apolipoprotéines. Athérosclérose et apolipoprotéines. *Ann. Inst. Pasteur, Actual.* G.N. Cohen, 2000.
- Basdevant A., Laville M., Lerebours E. *Traité de nutrition clinique de l'adulte.* Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 2001.
- Brousseau T., Duriez P., Fruchart J.-C. *Polymorphisme des gènes du métabolisme des lipoprotéines et pharmacogénétique des hypolipidémiants. Biochimie pathologique.* Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 2003.
- Toussaint J.-F., Jacob M.-P., Lagrost L., Chapman J. *L'athérosclérose : physiologie, diagnostics, thérapeutiques. Paris,* Masson, 2003.
- Beucler I., Turpin G. Métabolisme des lipoprotéines athérogènes. *Annales de médecine interne.* Paris 2001, 152 : 158-61.
- Marcil V., Peretti N., Delvin E., Levy E. Processus de digestion et d'absorption des lipides. *Gastroentérologie clinique et biologique*, 2004, 28 : 1257-66.

# Métabolisme des acides gras et des triglycérides

C. AUSSEL, Laboratoire de biologie, Hôpital Émile Roux, Limeil-Brévannes.

*Il existe une régulation entre les activités de synthèse et de dégradation des acides gras et des triglycérides (TG). Cette régulation est modulée par l'état nutritionnel et hormonal. La lipogenèse vise à la synthèse de novo des acides gras (AG) et leur captation par les adipocytes. Il y a ensuite estérification du glycérol et mise en réserve sous forme de triglycérides. Inversement, la lipolyse correspond aux activités visant à l'hydrolyse des liaisons entre le glycérol et les acides gras, à la libération puis à l'oxydation des acides gras dans différents tissus.*

# I. Généralités

## A. Principaux acides gras

Les acides gras sont des acides carboxyliques répondant à la formule générale suivante lorsqu'ils sont saturés :

$$CH_3 - (CH_2)_n - C_{(1)}OOH$$

Ils peuvent également être monoinsaturés (une double liaison) ou polyinsaturés (deux doubles liaisons ou plus). Certains acides gras ne peuvent être synthétisés par l'organisme. Ils sont dits « essentiels » (acides linolénique et linoléique).

| Nombre de carbones | Nombre de doubles liaisons – position(s) – | Nom commun |
|---|---|---|
| 8 | 0 | Ac. caprylique |
| 10 | 0 | Ac. caprique |
| 12 | 0 | Ac. laurique |
| 14 | 0 | Ac. myristique |
| 14 | 1 | Ac. myristoléique |
| 16 | 0 | Ac. palmitique |
| 16 | 1(9) | Ac. palmitoléique |
| 18 | 0 | Ac. stéarique |
| 18 | 1(9) | Ac. oléique |
| 18 | 2(9,12) | Ac. linoléique |
| 18 | 3(9,12,15) | Ac. linolénique |
| 20 | 0 | Ac. arachique |
| 20 | 4(5,8,11,14) | Ac. arachidonique |

Les concentrations plasmatiques moyennes en acides gras libres varient de 100 à 1 200 µmol/L. Les acides gras plasmatiques sont transportés par l'albumine.

## B. Origine des acides gras libres circulants

Chez l'homme, la majorité des acides gras sont exogènes : l'apport alimentaire couvre largement les besoins de l'organisme. Toutefois, de nombreuses cellules, mais surtout les hépatocytes et adipocytes, sont capables de synthétiser des acides gras endogènes. Normalement, le niveau de synthèse est bas sauf en cas de régime hyperglucidique où l'acétyl-CoA issu de la glycolyse emprunte la voie de synthèse des acides gras. L'origine des acides gras dépend de l'état nutritionnel de l'organisme :

- durant le jeûne, l'exercice ou le stress, les triglycérides de réserve du tissu adipeux sont hydrolysés. Les acides gras, libérés dans le plasma, se lient à l'albumine puis sont délivrés aux différents tissus. Le passage transmembranaire des acides gras était considéré autrefois comme un processus non spécifique. Il apparaît maintenant comme spécifique et implique la présence d'une protéine transporteuse, la FABP (*plasma membrane fatty acid-binding protein*). Ce transport est sodium-dépendant et est probablement régulé par différentes hormones. Les acides gras sont soit métabolisés avec production d'énergie, surtout au niveau hépatique, soit mis en réserve de nouveau dans les lipides tissulaires ;
- après les repas, les graisses animales ou végétales sont absorbées et ne fournissent que des triglycérides à chaînes longues (TCL). Ceux-ci, en présence de sels biliaires, forment des micelles duodénales qui sont l'objet d'une hydrolyse pancréatique (lipase). Le transfert des AG libres dans l'entérocyte conduit à une réestérification du glycérol en TCL et à leur sécrétion sous forme de chylomicrons dans le système lymphatique puis dans la circulation générale *via* le canal thoracique (voir « *Métabolisme des lipoprotéines* »). Les TCL sont alors hydrolysés par la lipoprotéine lipase endothéliale. Une fois à l'intérieur des cellules, les AG libres sont estérifiés en TG ou en phospholipides.

# II. Biosynthèse des triglycérides

La synthèse des lipides membranaires (glycérophospholipides) se fait dans toutes les cellules des organismes vivants. La synthèse des triglycérides se fait dans les adipocytes et un peu dans d'autres cellules (hépatocytes, entérocytes). La synthèse de ces différents glycérolipides à partir du glycérol a été décrite par E. P. Kennedy. Dans les entérocytes, ce sont les 2-monoacylglycérols qui sont réestérifiés en triacylglycérol par les acides gras à longues chaînes préalablement activés sous forme d'acyl-CoA. Le 2-monoacylglycérol ainsi que les acides gras proviennent de l'hydrolyse des lipides alimentaires par la lipase pancréatique.

Au plan adipocytaire ou hépatocytaire, la synthèse des TG requiert une source de glycérol 3-phosphate qui sera fournie par la glycolyse (*fig. 1*). Deux voies de production existent :

- la première est présente à la fois dans l'adipocyte et l'hépatocyte. Le dihydroxyacétone phosphate est réduit en glycérol 3-phosphate par la glycérophosphate déshydrogénase ;

- la seconde voie de production se trouve uniquement dans le foie : conversion du glycérol libre en glycéro-3-phosphate par la glycérol kinase. Cela implique qu'en cas d'hypoglycémie ou de concentration basse en insuline, l'adipocyte ne captant plus de glucose ne pourra pas synthétiser le glycérol 3-phosphate.

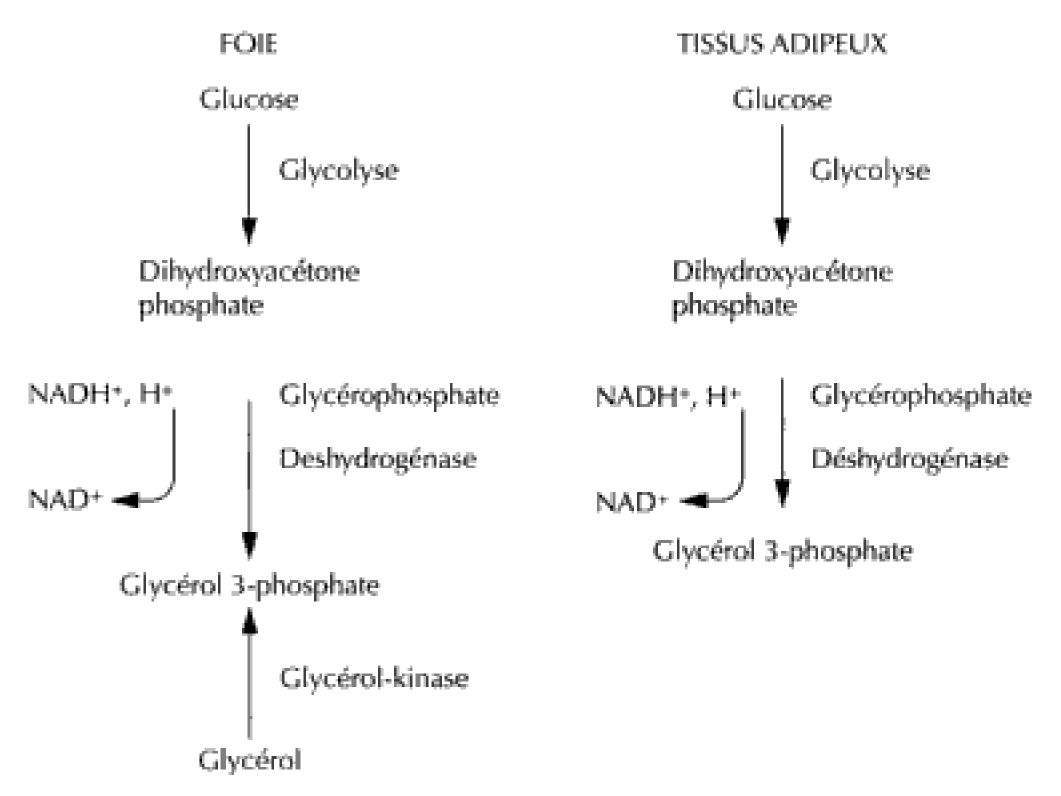



**Figure 1.** Voies de production du glycérol 3-phosphate dans le foie et le tissu adipeux

La synthèse des triglycérides (*fig.* 2) s'effectue par transfert sur le glycérol 3-phosphate d'acides gras activés [associés au coenzyme A par une liaison thioester (acyl-CoA)]. Il y a quatre réactions : les deux premières sont des estérifications catalysées par des glycérophosphates acyltransférases. La réaction est spécifique du glycérol 3-phosphate et des acyl-CoA saturés ou insaturés ayant plus de dix atomes de carbone. La meilleure efficacité de biosynthèse est obtenue avec les acyls saturés en $C_{16}$ et $C_{18}$, mais la position 2 est occupée par un acyl insaturé.

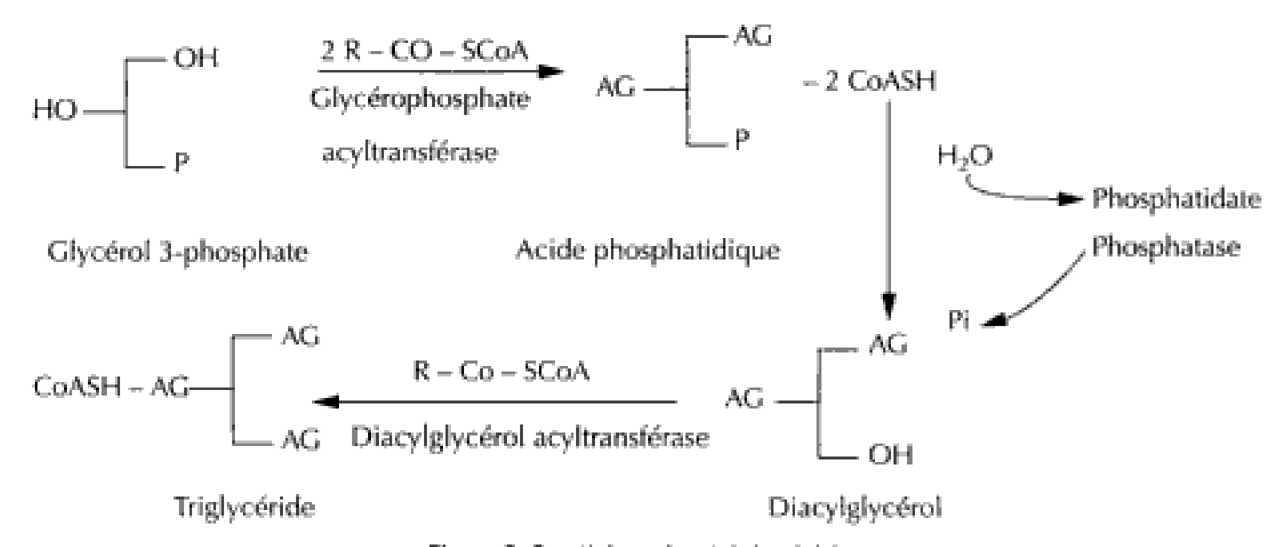



**Figure 2.** Synthèse des triglycérides

Il y a apparition d'un acide phosphatidique qui est déphosphorylé par une phosphatidate phosphatase libérant le groupement phosphate et donnant naissance à un diacylglycérol. La phosphatidate phosphatase est l'enzyme régulatrice de la synthèse des glycérolipides (voies de Kennedy). La transcription du gène de la phosphatidate phosphatase est contrôlée par l'insuline. Une dernière estérification catalysée par le diacylglycérol acyltransférase aboutit à la formation de triglycérides.
Dans les adipocytes, les TG formés sont mis en réserve dans le cytoplasme pour une mobilisation ultérieure dans un dessein énergétique. Dans le foie, les triglycérides sont incorporés aux lipoprotéines de très basse densité (*very low denstity lipoprotein* – VLDL) qui, sécrétées dans le sang circulant, fourniront les substrats énergétiques aux tissus.

# III. Catabolisme des triglycérides

On distinguera le catabolisme des triglycérides d'origine alimentaire au plan intestinal et le catabolisme de ces molécules aux niveaux sanguin, hépatique et adipocytaire.

## A. Catabolisme intestinal des triglycérides d'origine alimentaire

La dégradation des triglycérides alimentaires est un événement important de la digestion. Elle s'effectue au niveau de l'intestin grêle. Elle met en jeu la lipase, dont la plus importante est la lipase pancréatique. Le substrat de cette enzyme étant insoluble en milieu aqueux, il se présente sous forme de micelles. Le passage sous la forme micellaire est favorisé par la présence de substances tensioactives, les acides biliaires. L'action hydrolysante de la lipase enzymatique colipase-lipase est adsorbée à l'interface triglycéride-eau et la lipase exerce son action catalytique.
Les différents produits de la dégradation intestinale des triglycérides (glycérol, acides gras libres, monoglycérides ou diglycérides) sont absorbés par la muqueuse intestinale. Selon les produits, deux destinées sont possibles : le glycérol et les acides gras à chaîne courte sont transportés dans le foie *via* la veine porte. Les monoglycérides, les diglycérides et les acides gras à longue chaîne sont utilisés au niveau des entérocytes pour la resynthèse de triglycérides. Ces derniers rejoindront la circulation sanguine *via* le système lymphatique sous forme de chylomicrons.

## B. Catabolisme tissulaire

L'hydrolyse des triglycérides peut intervenir aux niveaux extra- et intracellulaire. Dans le premier cas, l'enzyme est la lipoprotéine lipase (LPL) qui hydrolyse les triglycérides des chylomicrons ou des VLDL au niveau de l'endothélium vasculaire. Dans le second cas, la lipase hormonosensible catalyse l'hydrolyse des triglycérides intracellulaires.

## 1. Lipoprotéine lipase

L'hydrolyse des triglycérides par la lipoprotéine lipase est une étape importante pour la mise en réserve des acides gras. La LPL est synthétisée dans bon nombre de cellules mais tout particulièrement dans les adipocytes et les cellules musculaires. Après sa synthèse (stimulée par l'insuline et l'adénosine), elle est transportée jusqu'au capillaire sanguin où elle se fixe sur la face luminale des cellules endothéliales par l'intermédiaire d'un cofacteur indispensable : l'apo CII. Puis, elle se lie aux glycosylaminoglycannes de l'endothélium vasculaire. Son rôle essentiel est de permettre aux lipoprotéines circulantes les plus riches en triglycérides (VLDL et chylomicrons) de livrer leurs AG aux tissus. Les acides gras libérés seront, pour la majorité, utilisés par les tissus qui vont les oxyder (cellules cardiaques ou musculaires) ou les mettre en réserve sous forme de TG (adipocytes). Une faible partie des AG ne sera pas captée et se fixera à l'albumine plasmatique.
La lipoprotéine lipase a une faible spécificité de substrat. Elle hydrolyse aussi bien les TG des chylomicrons que ceux des VLDL. L'acide gras estérifiant le glycérol peut être à chaîne longue ou moyenne, saturé ou insaturé. La LPL hydrolyse les TG à la surface des particules, agissant ainsi à l'interface lipide-eau, l'enzyme étant hydrosoluble. Il a été envisagé également qu'elle possède une activité phospholipasique. Ainsi, en hydrolysant partiellement les phospholipides superficiels des chylomicrons, elle aurait accès au cœur des particules constitué par les triglycérides. L'activité de la lipoprotéine lipase est régulée par de nombreux facteurs :

- l'apo CII a un rôle activateur ;
- les acides gras ont un effet inhibiteur, cela constituant un rétrocontrôle ;
- l'état nutritionnel :
  - dans la période postprandiale, les TG circulants sont destinés essentiellement à la mise en réserve et donc captés préférentiellement grâce à la LPL du tissu adipeux :
    - à l'état de jeûne, les AG sont davantage hydrolysés par le tissu cardiaque que par le tissu adipeux. Cela peut s'expliquer par l'existence d'enzymes à propriétés cinétiques différentes. Les LPL du cœur ont un Km bas alors que celui des LPL du tissu adipeux est dix fois plus élevé. Ainsi, pour un taux normal en triglycérides, la LPL du cœur est saturée alors que celle du tissu adipeux ne l'est pas,
    - à côté de cette régulation passive, il existe des mécanismes de régulation active. L'activité LPL est plus élevée dans le tissu adipeux d'animaux nourris que dans celui d'animaux à jeun, et inversement pour le cœur. Ces changements d'activités sont sous contrôle hormonal et notamment celui de l'insuline qui stimule les processus de synthèse, de glycosylation et de sécrétion de la LPL adipocytaire.

## 2. Lipase hormonosensible

Il s'agit d'une triglycéride lipase cellulaire qui hydrolyse les triglycérides au niveau des hépatocytes qui ont été apportés par les lipoprotéines résiduelles du catabolisme des chylomicrons et les VLDL. Cette lipase intervient après la lipoprotéine lipase. Elle agit également au niveau intra-adipocytaire, où l'enzyme hydrolyse les triglycérides de réserve pour couvrir les besoins énergétiques lors du jeûne, par exemple. Sous l'action de trois lipases successives, les triglycérides sont hydrolysés en AG libres et glycérol.

La première enzyme intervenante est la lipase hormonosensible qui scinde les liaisons esters en 1 et/ou 3 – il s'agit de l'étape limitante. Des lipases spécifiques des diglycérides et monoglycérides achèvent l'hydrolyse. Le glycérol issu de l'hydrolyse enzymatique est totalement libéré dans le plasma. Il n'est pas réutilisé *in situ* pour la synthèse de TG, car sa transformation en glycérol 3-phosphate ne peut avoir lieu dans l'adipocyte en raison d'une très faible activité glycérol kinase. Il est en revanche phosphorylé dans l'hépatocyte où le glycérol 3-phosphate sera utilisé pour la synthèse de TG ou converti en dihydroxyacétone phosphate (DHAP) pour la néoglucogenèse.
La régulation de l'activité lipolytique de l'adipocyte repose sur l'activation de la lipase hormonosensible par un mécanisme de phosphorylation-déphosphorylation (*fig. 3*). La phosphorylation spécifique de la lipase est catalysée par une protéine kinase AMP cyclique dépendante.
Les périlipines ont récemment été mises en évidence dans l'adipocyte. Elles ont un effet inverse à celui de la lipase hormonosensible en protégeant les triglycérides de l'hydrolyse et en augmentant leur stockage. Leur régulation est modulée par un mécanisme de phosphorylation-déphosphorylation. Elles sont actives sous forme déphosphorylée.

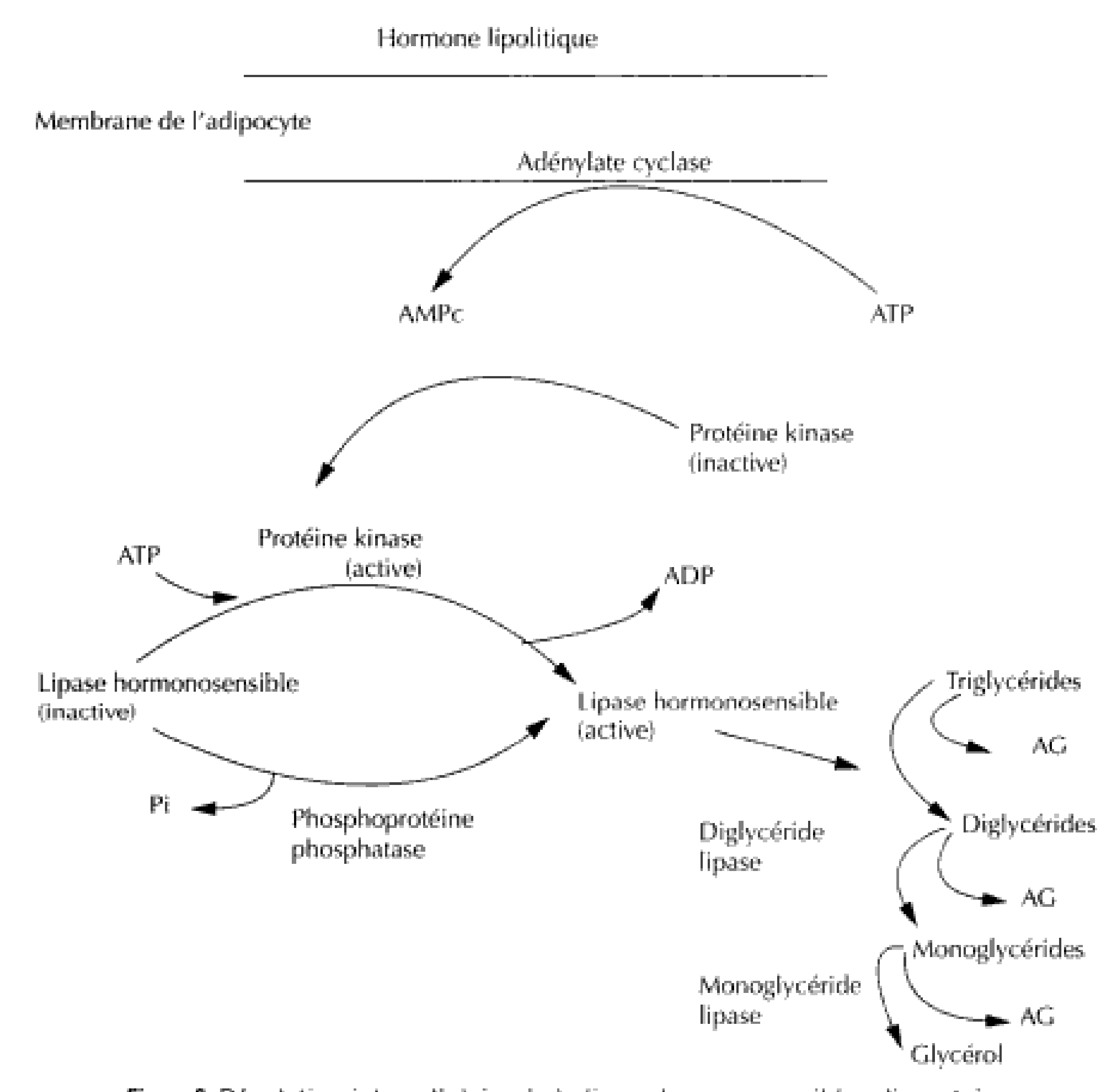



**Figure 3.** Régulation intracellulaire de la lipase hormonosensible adipocytaire

D'une façon générale, on admet que les hormones à action lipolytique (glucagon, ACTH, adrénaline) provoquent une augmentation du taux intracellulaire d'AMP cyclique en stimulant l'activité adénylate cyclase au niveau membranaire. C'est l'étape d'activation de la lipolyse. La libération dans le cytoplasme de l'AMP cyclique provoque l'activation de la protéine kinase qui entraîne, en présence d'adénosine triphosphate (ATP), la phosphorylation de la lipase inactive en lipase phosphorylée active. Quant à l'action antilipolytique de l'insuline, elle ne dépendrait pas uniquement du taux d'AMP cyclique intra-adipocytaire. L'enzyme est inhibée également par les acides gras non estérifiés : il s'agit d'une autorégulation.

### C. Métabolisme des triglycérides dans le tissu adipeux

Il s'agit essentiellement d'un tissu de stockage des triglycérides et de distribution des acides gras. L'hydrolyse des triglycérides des chylomicrons et VLDL par la lipoprotéine lipase plasmatique produit des acides gras absorbés par les adipocytes. Ceux-ci permettent la resynthèse des triglycérides. Il existe également, en fonction des besoins, une lipolyse adipocytaire. La lipase hormonosensible hydrolyse les triglycérides. Les acides gras sont mis à disposition des tissus consommateurs, muscles et myocarde.
L'accumulation des triglycérides dans l'adipocyte induit l'expression du gène de la leptine. Cette hormone protéique a plusieurs tissus cibles. Elle peut traverser les membranes, en particulier la barrière hématoméningée. Au niveau hypothalamique, en se liant à son récepteur, la leptine induit une cascade de réactions aboutissant à la production de neuropeptides inhibiteurs de l'appétit. La leptine entraîne une diminution de la mise en réserve des triglycérides.

### D. Métabolisme des triglycérides dans le muscle ou le myocarde

Il s'agit de tissus qui consomment les acides gras. Ceux-ci proviennent de l'hydrolyse des triglycérides constitutifs des chylomicrons et des VLDL par la lipoprotéine lipase plasmatique ou des acides gras libérés par les adipocytes. Ces acides gras sont utilisés pour couvrir les besoins énergétiques ou réestérifiés en triglycérides. Toutefois, à la différence du tissu adipeux dont les acides gras des triglycérides sont utilisés ailleurs, le stock est ici constitué en vue d'une utilisation ultérieure sur place.

## IV. Catabolisme des acides gras, la β-oxydation

Les acides gras sont des nutriments utilisés par les cellules pour produire de l'énergie. L'oxydation des acides gras permet la production de l'ATP par différentes voies métaboliques : cela constitue la lipolyse. Parmi ces voies métaboliques, on distingue : la β-oxydation, le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire et mitochondriale.

## A. Acides gras saturés

La β-oxydation est une voie énergétique qui s'effectue, environ pour 90 %, au niveau mitochondrial. Il existe également une localisation peroxysomiale. Cette voie oxydative mitochondriale fut mise en évidence par Knopp. De nombreux tissus sont capables de réaliser la β-oxydation (rein, muscle, tissu adipeux), mais elle se déroule surtout dans le foie où les acides gras proviennent essentiellement de l'hydrolyse adipocytaire des triglycérides. Les acides gras constituent une source énergétique très importante. On estime que leur oxydation fournit plus de 40 % des besoins énergétiques chez un sujet soumis à un régime normal. Leur dégradation libère une quantité d'énergie supérieure à celle que fournirait un même poids de glucose. La dégradation des acides gras aboutit à la formation d'acétyl coenzyme A. Avant de subir les quatre étapes de la β-oxydation, les acides gras doivent être activés et transférés dans la mitochondrie.

### 1. Passage des acides gras du cytosol dans la mitochondrie

Il se fait en trois étapes : activation, transfert et libération.

#### a) Activation des acides gras

Il s'agit d'un préalable indispensable à leur métabolisme. L'adénosine triphosphate (ATP) permet la formation d'une liaison thioester entre le groupe carboxyle d'un acide gras et le groupe sulfhydryle du coenzyme A (CoA). Cette réaction est catalysée par l'acyl-CoA synthétase : il existe trois types d'enzymes en fonction de la longueur de l'acide gras ($C_2$-$C_3$, $C_4$-$C_{12}$, $C_{10}$-$C_{18}$). La réaction s'effectue en deux étapes :

- formation d'un acyl adénylate :

$$R{-}C\begin{smallmatrix}\nearrow O\\ \searrow O^{\ominus}\end{smallmatrix} + ATP \longleftrightarrow R{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}{-}AMP + P{-}P \;(\searrow 2\,Pi)$$

- formation de l'acyl-CoA :

$$R{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}{-}AMP + CoASH \longleftrightarrow R{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}{-}SCoA + AMP$$

Ces réactions sont librement réversibles. Toutefois, le pyrophosphate (PP) étant hydrolysé par une pyrophosphatase (en donnant naissance à deux molécules d'$H_3PO_4$), il y a irréversibilité dans le sens de formation des acyl-CoA. Deux molécules d'ATP sont utilisées à chaque activation d'acyl. En effet, l'AMP libéré est phosphorylé en adénosine-5'-diphosphate (ADP) en présence d'ATP et d'adénylate kinase.

### b) Transfert sur la carnitine

Les enzymes de la β-oxydation étant localisées dans la mitochondrie, les acyl-CoA doivent franchir la membrane mitochondriale pour être oxydés. Les molécules d'acyl-CoA à longues chaînes ne peuvent pas traverser la membrane mitochondriale. Il y a transfert du fragment acyl sur un composé plus petit, la carnitine, qui transporte l'acyl-CoA à travers la membrane mitochondriale (*fig. 4*). La fonction alcool secondaire de la carnitine est estérifiée par l'acide gras pour former l'acylcarnitine. Cette réaction se fait avec une faible variation d'énergie libre, de sorte que la liaison acyl-carnitine représente une liaison riche en énergie. L'acylcarnitine traverse la membrane interne mitochondriale grâce à un transporteur, l'acylcarnitine translocase : l'entrée dans la matrice mitochondriale de l'acylcarnitine est couplée à la sortie de la carnitine en direction du cytoplasme.

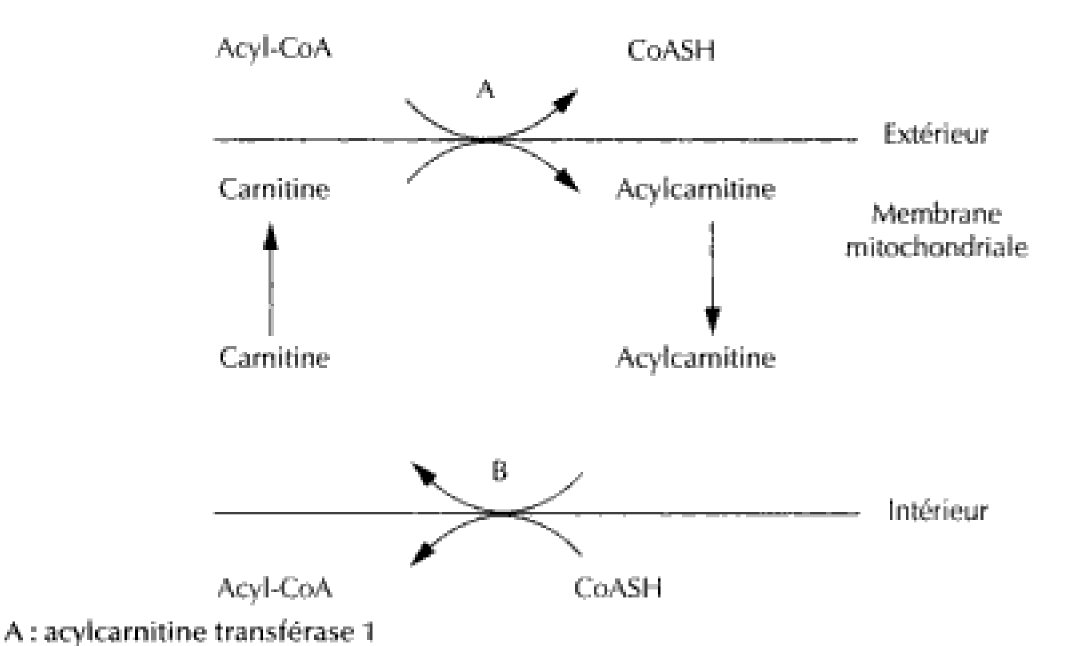



**Figure 4.** Transport des acides gras à travers la membrane mitochondriale

### c) Libération de l'acyl-CoA

Dans l'espace intramitochondrial, le groupement acyl est transféré sur le coenzyme A mitochondrial pour former un acyl-CoA qui peut subir la β-oxydation. Les réactions du transfert sont contrôlées par les acylcarnitines transférase 1 externe et 2 mitochondriales. La carnitine n'est pas nécessaire au transfert des acides gras à chaînes moyennes ($C_8$, $C_{10}$). L'acylcarnitine transférase situé sur la membrane externe de la mitochondrie est l'enzyme la plus lente de la lipolyse. Elle catalyse l'étape d'engagement de l'acide gras dans le métabolisme énergétique. Il s'agit de l'enzyme clé de la lipolyse.

## 2. Étapes de la β-oxydation

Chaque tour de β-oxydation ampute une molécule d'acétyl-CoA. L'extrémité COOH terminale est le point de départ de cette oxydation (*fig. 5*).

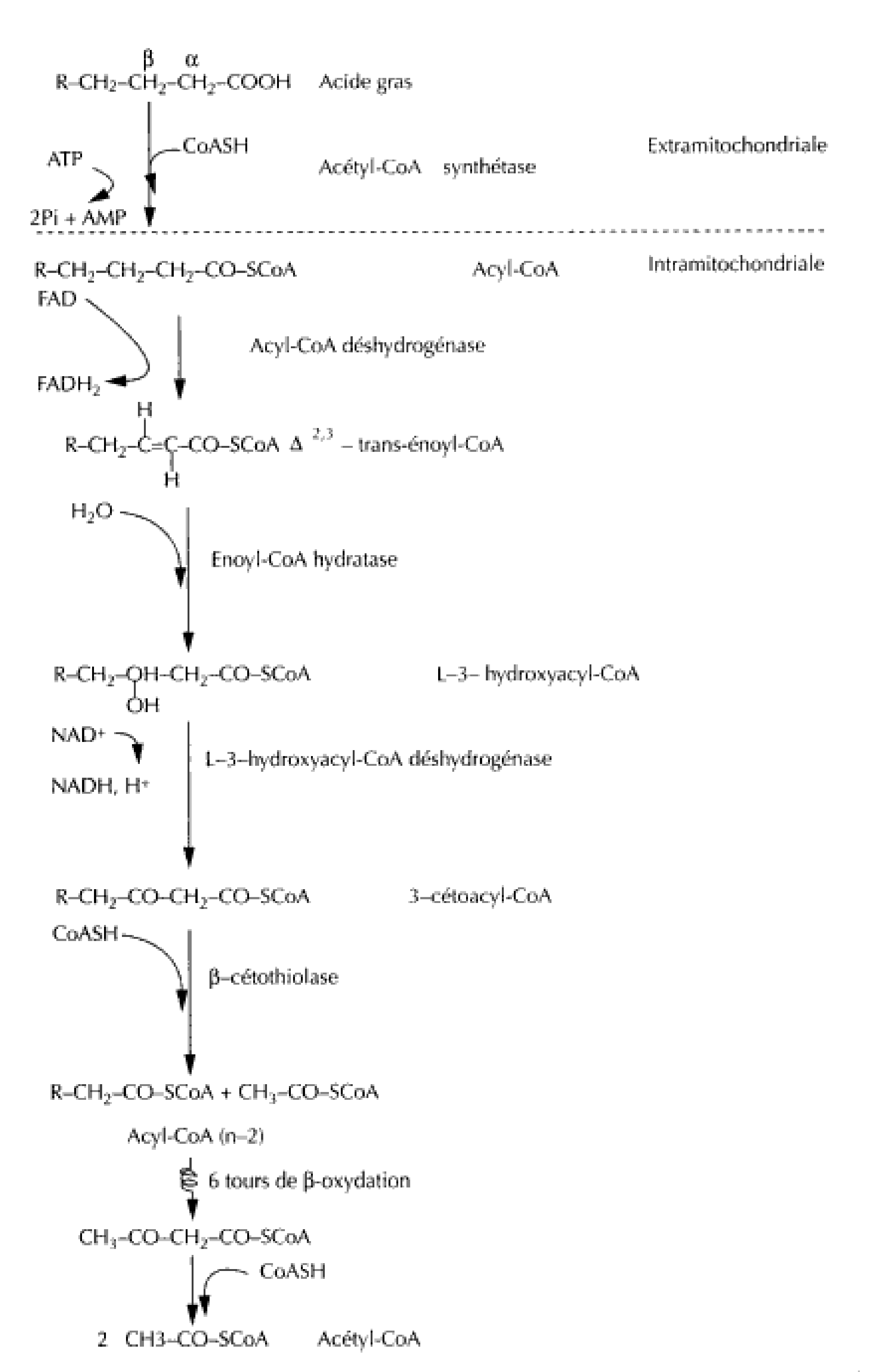



**Figure 5.** β-oxydation intramitochondriale d'un acide gras saturé en $C_{18}$ (acide palmitique)

### a) Déshydrogénation

La déshydrogénation des acyl-CoA est catalysée par des déshydrogénases qui sont des flavoprotéines à flavine adénine dinucléotide (FAD). Chacune est spécifique d'un groupe d'acides gras en fonction de la longueur de la chaîne (la butyryl-CoA déshydrogénase agit sur les acides gras ayant de quatre à huit atomes de carbone, l'octanoyl déshydrogénase de $C_8$ à $C_{18}$ et l'hexadécanoyl déshydrogénase à partir de $C_{16}$). Ces enzymes interviennent uniquement dans le sens de la déshydrogénation au niveau des atomes de carbone $\alpha$ et $\beta$ (ou 2 et 3). Il se forme une double liaison trans entre $C_2$ et $C_3$ et apparition du $\Delta^{2,3}$-trans-énoyl-CoA et d'une molécule de FAD réduite. Cette dernière sera ramenée à l'état oxydé dans la chaîne respiratoire avec un gain de deux ATP. En effet, les hydrogènes sont captés par une flavoprotéine de la matrice, l'ETF (*electron transfer flavoprotein*), celle-ci jouant le rôle de coenzyme transporteur d'électrons. Une ETF déshydrogénase de la membrane interne de la mitochondrie oxyde l'ETF et transmet les hydrogénases au coenzyme Q de la chaîne respiratoire.

### b) Hydratation de la double liaison

Cette réaction est catalysée par l'énoyl-CoA hydratase. L'hydratation sur le carbone $\beta$ est stéréospécifique : seul l'isomère L est formé. Des énoyls-CoA hydratases, spécifiques des énoyls-CoA à chaîne courte, sont aussi appelées « crotonases ». Il existe aussi des énoyls-CoA hydratases spécifiques des énoyls-CoA à chaîne longue. Les énoyls-CoA hydratases sont peu spécifiques de l'isomère de la double liaison, de la portion de la double liaison et de l'orientation de l'hydroxyl de la fonction alcool : ces propriétés vont permettre une $\beta$-oxydation des acides gras insaturés.

### c) Oxydation de la fonction alcool

L'oxydation de la fonction alcool secondaire conduit à la formation d'une cétone, la 3-cétoacyl-CoA. Il y a intervention de la L-3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase, coenzyme à nicotinamide adénine dinucléotide (NAD). Le coenzyme est réduit lors de la réaction. Il sera réoxydé dans la chaîne respiratoire avec gain de trois ATP. L'équilibre de la réaction est déplacé en faveur des L-3-hydroxyacyl-CoA. La diminution du rapport NADH-NADH,$H^+$ lors de l'activité de la chaîne respiratoire entraîne une activation de la $\beta$-oxydation.

### d) Réaction de clivage

Il s'agit en réalité d'une thiolyse catalysée par une $\beta$-cétothiolase avec apparition d'un acétyl-CoA et d'un acyl-CoA amputé de deux atomes de carbone. Il existe plusieurs $\beta$-cétothiolase des $\beta$-cétoacyl-CoA à chaînes plus ou moins longues.
L'acyl-CoA subit alors d'autres cycles d'oxydation jusqu'à l'apparition d'un 3-cétoacyl-CoA à quatre atomes de carbone qui sera scindé en deux acétyl-CoA. À chaque cycle de réaction, un acyl-CoA est raccourci de deux atomes de carbone et un FADH (coenzyme $QH_2$), un NADH,$H^+$ et un acétyl-CoA sont formés.

## 3. Bilan énergétique de la $\beta$-oxydation

Nous prendrons comme exemple la dégradation de l'acide palmitique, acides gras saturés à seize atomes de carbone. La dégradation du palmityl-CoA nécessite sept tours de cycle. La réaction générale peut s'écrire :

$$\text{Palmityl-CoA} + 7\ FAD + 7\ NAD^+ + 7\ CoASH + 7\ H_2O \rightarrow$$
$$\text{8-acétyl-CoA} + 7\ FADH_2 + 7\ NADH,H^+$$

La réoxydation d'une molécule de $NADH,H^+$ et du $FADH_2$ (coenzyme $QH_2$) par la chaîne respiratoire mitochondriale permet la synthèse de trois et deux liaisons riches en énergie respectivement. L'oxydation de l'acétyl-CoA par le cycle de Krebs donne douze ATP, ainsi :

| | | |
|---|---|---|
| 7 × 2 | = | 14 ATP |
| 7 × 3 | = | 21 ATP |
| 8 × 12 | = | 96 ATP |
| | | 131 ATP |

À 131 liaisons riches en énergie, il faut en retirer deux, celles hydrolysées lors de l'activation du palmitate.

## 4. β-oxydation des acides gras dans les peroxysomes

Les peroxysomes sont des organites cellulaires qui doivent leur nom à leur contenu enzymatique leur permettant de métaboliser le peroxyde d'hydrogène. Ils participent à de nombreuses tâches cellulaires parmi lesquelles l'oxydation des acides gras, la formation des sels biliaires et la biosynthèse des éthers phospholipidiques.

La β-oxydation peroxysomiale contribue seulement pour 10 % à l'oxydation des acides gras. Elle se distingue de la β-oxydation mitochondriale par de nombreux aspects (*fig. 6*) :

- elle ne concerne que les acides gras à chaîne longue (C16 à C22) ;
- l'eau oxygénée produite sera détruite par les peroxydases et les catalases ;
- ces réactions ne permettent pas la synthèse de liaisons riches en énergie ;
- la première étape est catalysée par l'acyl-CoA oxydase avec production de peroxyde d'hydrogène. Il n'y a pas de couplage avec la chaîne respiratoire ;
- une protéine bifonctionnelle intervient dans les trois étapes suivantes :
  - les peroxysomes ont une préférence pour les AG polyinsaturés et à très longues chaînes (C > 22),
  - les AG à chaîne moyenne résultants sont transformés dans les peroxysomes en acylcarnitine,
  - ils sont ensuite oxydés dans la mitochondrie.

Il faut remarquer qu'il existe un certain nombre de maladies héréditaires liées à un déficit du métabolisme peroxysomial. Elles se caractérisent par une augmentation plasmatique des acides gras à longues chaînes. Les déficits enzymatiques peuvent être multiples avec peroxysomes hépatiques absents ou très réduits (maladie de Refsum infantile, syndrome de Zellweger et adrénoleucodystrophie néonatale) ou bien le déficit enzymatique est isolé (acyl-CoA oxydase : pseudo-adrénoleucodystrophie néonatale, β-cétothiolase peroxysomiale : pseudo-syndrome de Zellweger).

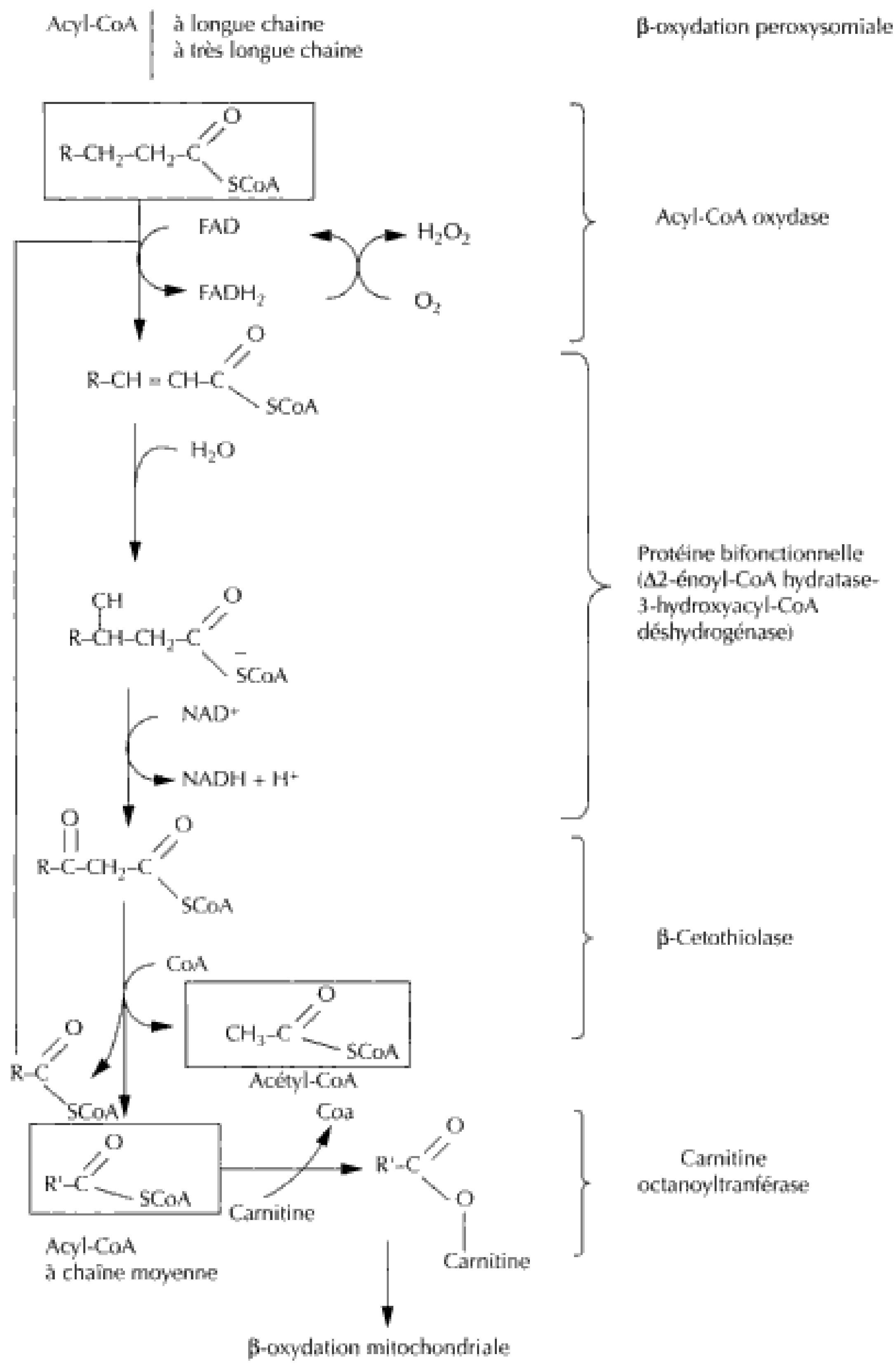



**Figure 6.** β-oxydation peroxysomiale des acides gras

## B. Acides gras insaturés

Beaucoup de réactions sont identiques à celles qui sont décrites pour les AG saturés mais il y a intervention d'isomérases. La *figure 7* représente l'oxydation du linoléate. Il s'agit d'un AG en $C_{18}$ insaturé possédant deux doubles liaisons entre $C_9$-$C_{10}$ et $C_{12}$-$C_{13}$. Après trois tours de dégradation, le 3-cis-6-cis-dodécadiénoyl-CoA (I)

formé n'est pas un substrat pour l'acyl-CoA déshydrogénase du fait de la double liaison déjà existante et de la position cis. La 3,2-énoyl-coenzyme A isomérase intervient en déplaçant la position et la configuration de la double liaison, pour former le composé II qui subit un autre tour de β-oxydation. Le composé IV est réduit par la 2,4-diénoyl-CoA réductase qui est NADP dépendante en composé V. Une isomérase déplace la double liaison, le composé VI peut alors subir quatre tours de β-oxydation pour libérer les groupements acétyl-CoA.

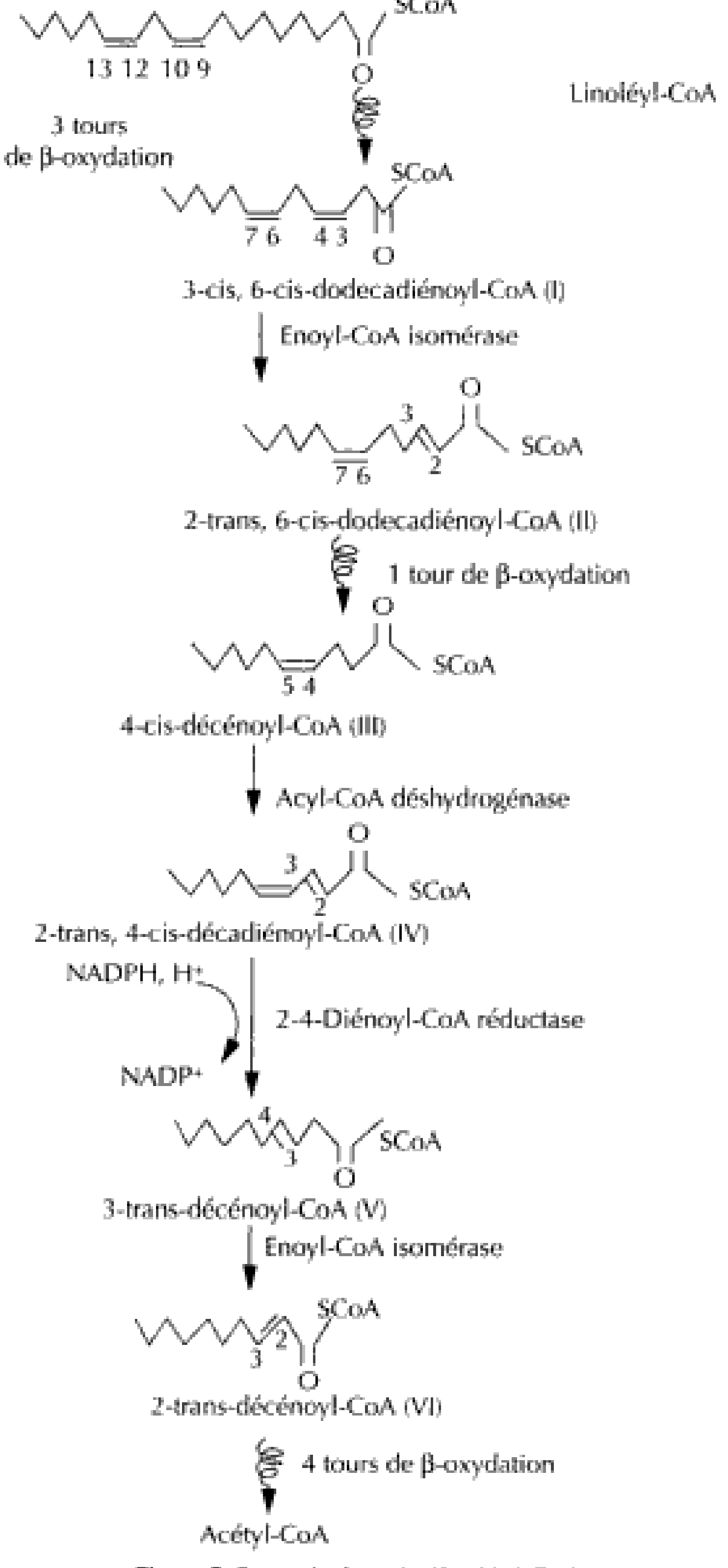


**Figure 7.** β-oxydation du linoléyl-CoA

## C. Acides gras à nombre impair d'atomes de carbone

Ces acides gras sont peu fréquents. Ils suivent la voie de la β-oxydation. Toutefois, l'étape finale libère une molécule d'acétyl-CoA et une molécule de propionyl-CoA. Ce dernier sera converti en méthyl-malonyl-CoA par une carboxylase, puis en succinyl-CoA oxydé ultérieurement dans le cycle de Krebs.

## D. ϖ-oxydation

Il s'agit d'une oxydation hépatique inhabituelle sur le groupement terminal $CH_3$, touchant de préférence les AG à nombre impair d'atomes de carbone. Il y a libération d'acides dicarboxyliques qui sont éliminés dans l'urine ou qui peuvent subir une β-oxydation à partir des deux extrémités. Trois acides principaux sont formés : acide sébacique ($C_{10}$), acide subérique ($C_8$) et acide adipique ($C_9$). Cette voie oxydative est vraisemblablement sous le contrôle de mono-oxygénases appartenant à la famille des cytochromes P450.

## E. Destinées de l'acétyl-CoA

Les destinées de l'acétyl-CoA, formé au cours de la β-oxydation, varient en fonction des conditions métaboliques et du tissu. Dans l'hépatocyte, l'acétyl-CoA a plusieurs destinées.

### 1. Destinée mitochondriale

- L'acétyl-CoA se condense avec l'oxaloacétate pour donner naissance au citrate oxydé dans le cycle de Krebs.
- L'acétyl-CoA se condense à une autre molécule d'acétyl-CoA pour former l'acétoacétyl-CoA, précurseur de la cétogenèse.

### 2. Destinée extramitochondriale

L'acétyl-CoA cytoplasmique (provenant du secteur mitochondrial par une navette citrate-pyruvate ou citrate-malate) est à l'origine de la synthèse de cholestérol ou d'acides gras (voir « *Cétogenèse* » pour la régulation de l'utilisation de l'acétyl-CoA).

# V. Biosynthèse des acides gras

De nombreux tissus peuvent synthétiser les acides gras, mais le tissu adipeux, le foie et l'intestin sont les plus actifs. Il peut s'agir d'allongement de chaînes d'acides gras ou de synthèse *de novo*. Dans ce dernier cas, la localisation est essentiellement hépatique. On connaît trois systèmes de synthèse des acides gras : cytoplasmique, microsomial et mitochondrial. Les deux derniers permettent surtout un allongement des chaînes d'acides gras existantes.

# A. Système cytoplasmique

## 1. Acides gras saturés à nombre pair d'atomes de carbone

La synthèse d'acides gras *de novo* aboutit à des acides dont la chaîne atteint 16 à 18 atomes de carbone. Les acides gras sont synthétisés de toutes pièces à partir d'acétyl-CoA (l'origine de ce dernier sera traitée plus loin). La première étape est la formation de malonyl-CoA, suivie de plusieurs réactions catalysées par des enzymes organisées en un complexe appelé « acide gras synthétase ».

### a) Formation du malonyl-CoA

La synthèse des acides gras commence avec la carboxylation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA par l'intermédiaire de l'acétyl-CoA carboxylase, système multienzymatique contenant la biotine comme groupement prosthétique. Cette dernière est liée à une protéine de faible masse moléculaire appelée « *biotine carboxyl carrier protein* » (BCCP) qui fixe le $CO_2$. Ce système comporte deux enzymes : la biotine carboxylase catalysant la carboxylation de la biotine et la transcarboxylase, qui transfère le $CO_2$ de la BCCP sur l'acétyl-CoA.
Le groupement biotinyle sert de bras mobile transportant le $CO_2$ à l'acétyl-CoA. C'est au niveau de l'étape catalysée par l'acétyl-CoA carboxylase que s'effectue la régulation de la synthèse des acides gras : il s'agit d'une enzyme clé de la lipogenèse.

Biotine-enzyme + ATP + $CO_2$ + $H_2O$ ⟶ Carboxy-biotinyl-enzyme + ADP + Pi + $H^+$

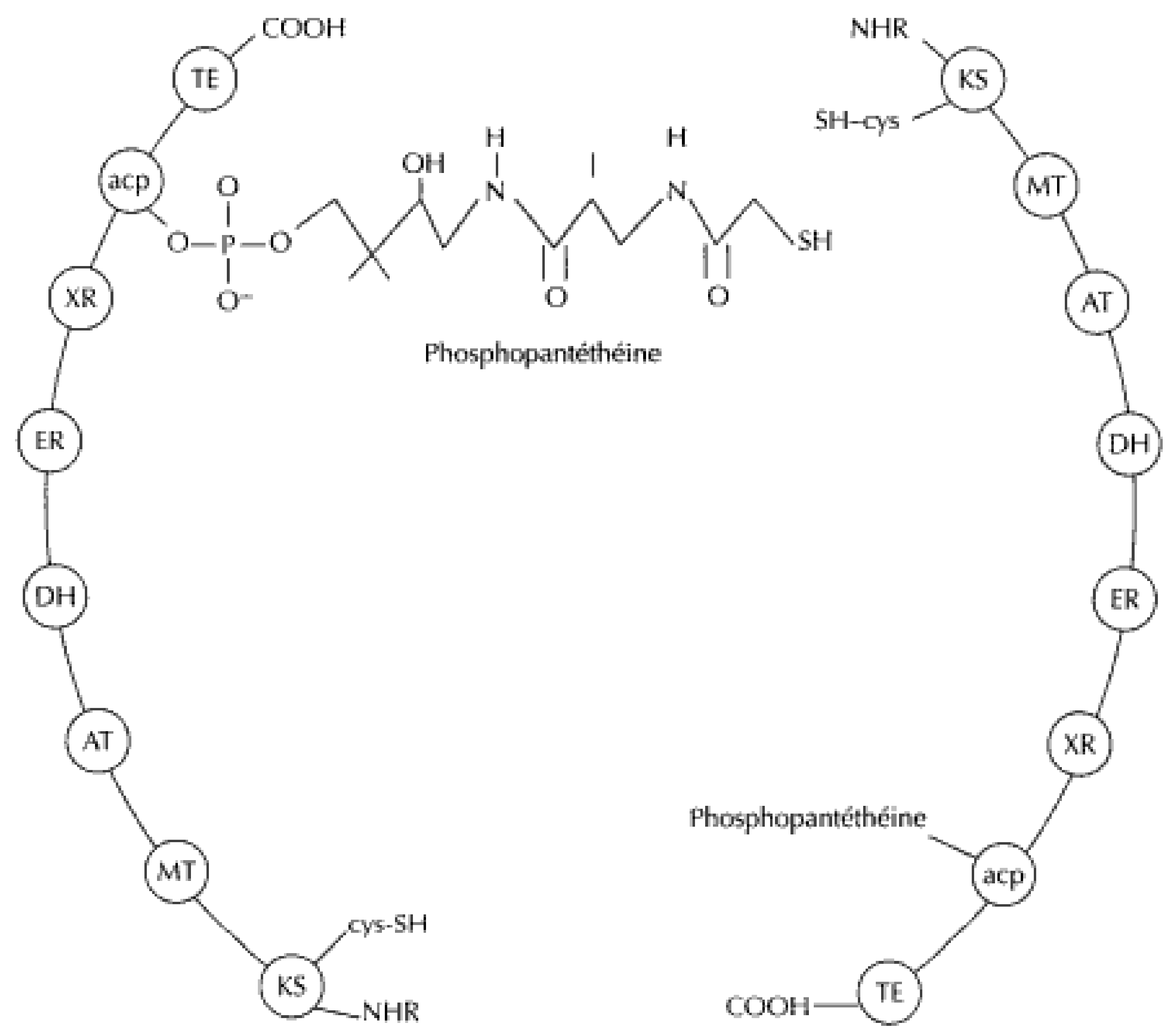
Carboxy-biotinyl-enzyme + Acétyl-CoA ⟶ Malonyl-CoA + biotine-enzyme

Bilan :

$$\underset{\text{Acétyl-CoA}}{H_3C-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-SCoA} + ATP + CO_2 + H_2O \longrightarrow \underset{\text{Malonyl-CoA}}{\underset{\underset{\displaystyle OH}{|}}{\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}}-CH_2-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-SCoA} + ADP + Pi + H^+$$

### b) Le complexe acide gras synthétase

Il s'agit d'un complexe multienzymatique comprenant deux protomères qui sont associées tête-bêche afin de former un homodimère. Leur liaison est favorisée par un taux élevé de fructose 1,6-diphosphate. Chaque sous-unité possède sept activités enzymatiques. Ce complexe est schématisé *figure 8*.
Il renferme deux types de groupe thiol : un groupe thiol appartenant à l'enzyme condensante (β-cétoacyl-ACP synthétase) appelé « thiol périphérique » et un groupe thiol dit « central » qui fait partie d'une protéine particulière, l'ACP (*acyl carrier protein*). L'ACP possède à son extrémité terminale une molécule de phosphopantéthéine sur laquelle, par l'intermédiaire du groupe thiol, se fixeront, par des liaisons thioesters, les intermédiaires de synthèse des acides gras. La flexibilité




TE, thioestérase ; KR, β-cétoacyl-ACP réductase ; ER : énoyl-ACP réductase,
DH : β-hydroxyacyl-ACP déshydratase, AT : ACP-acyltransférase,
MT : ACP-malonyltransférase, KS : β-cétoacyl-ACP synthétase.

**Figure 8.** Représentation schématique de l'association tête-bêche des deux sous-unités formant le complexe multienzymatique acide gras synthétase

de la partie phosphopantéthéique permet à la chaîne d'acides gras en formation de venir au contact du site actif de chaque enzyme du complexe. Le système acide gras synthétase est représenté schématiquement :

HS — Thiol central
＞E
HS — Thiol périphérique

### c) Réaction initiale : transfert d'acyl

À partir d'acétyl-CoA, une molécule d'acétate est transférée sur le groupe thiol de l'ACP par l'ACP acyltransférase. Puis le fragment à deux carbones est transféré sur le résidu cystéine de l'enzyme condensante :

$$CH_3—CO—SCoA + (HS)(HS)E \longleftrightarrow (CH_3—CO—S)(HS)E + CoASH \longleftrightarrow (HS)(CH_3—CO—S)E$$

### d) Transfert du malonyl-CoA

En présence de l'ACP malonyltransférase, le groupement thiol de l'ACP fixe le malonate :

$$COOH{-}CH_2{-}CO{-}SCoA + \begin{matrix} HS \\ CH_3{-}CO{-}S \end{matrix}\!\!>\!E \longleftrightarrow \begin{matrix} COOH{-}CH_2{-}CO{-}S \\ CH_3{-}CO{-}S \end{matrix}\!\!>\!E + CoASH$$

Le complexe acide gras synthétase possède alors deux groupements acyls liés par covalence, un acétyl sur le SH de la cystéine de la synthétase et un malonyl sur le SH de la phosphopantéthéine.

### e) Réaction de condensation

Les groupes acétyl et malonyl se condensent pour former l'acétoacétyl-S-ACP avec perte d'une molécule de $CO_2$. L'enzyme est la β-cétoacyl-ACP synthétase (enzyme condensante) :

$$\begin{matrix} COOH{-}CH_2{-}CO{-}S \\ CH_3{-}CO{-}S \end{matrix}\!\!>\!E \longleftrightarrow \begin{matrix} CH_3{-}CO{-}CH_2{-}CO{-}S \\ HS \end{matrix}\!\!>\!E$$

L'acétyl déplace le carboxyle libre du malonyl sous forme de $CO_2$. Le $CO_2$ n'est pas fixé de façon permanente par liaison covalente au cours de la biosynthèse des acides gras, mais joue un rôle catalytique dans cette synthèse puisqu'il est régénéré lorsque l'unité dicarbonée est insérée.

### f) Réduction de l'acétoacétyl-S-ACP

Le groupe cétone est converti en alcool par l'intermédiaire de la β-cétoacyl-ACP réductase, enzyme à NADP réduit. Le produit formé est l'isomère D de l'acide 3-hydroxybutyryl-S-ACP :

$$\begin{matrix} CH_3{-}CO{-}CH_2{-}CO{-}S \\ HS \end{matrix}\!\!>\!E \xrightarrow[NADPH,H^+ \;\rightarrow\; NADP^+]{} \begin{matrix} CH_3{-}CHOH{-}CH_2{-}CO{-}S \\ HS \end{matrix}\!\!>\!E$$

### g) Déshydratation

Une molécule d'eau est éliminée, cette réaction est catalysée par la β-hydroxyacyl-ACP déshydratase. Le composé formé est un crotonyl-5-ACP qui a une structure trans :

$$\begin{matrix} CH_3{-}CHOH{-}CH_2{-}CO{-}S \\ HS \end{matrix}\!\!>\!E \longleftrightarrow \begin{matrix} CH_3{-}\overset{H}{\overset{|}{C}}{=}\underset{\underset{H}{|}}{C}{-}CO{-}S \\ HS \end{matrix}\!\!>\!E + H_2O$$

### h) Réduction

Le crotonyl-S-ACP est réduit en butyryl-S-ACP par l'énoyl-ACP réductase en présence de NADP réduit :

$$CH_3-CH{=}CH-CO-S-E-SH + H_2O \xrightarrow[NADP,H^+ \;\to\; NADP^+]{} CH_3-CH_2-CH_2-CO-S-E-SH$$

À la fin du premier tour, est formé un acyle de quatre atomes de carbone lié au –SH de l'ACP.

### i) Allongement de la chaîne

Le groupement butyryl doit être transféré sur le thiol périphérique pour laisser libre le thiol central sur lequel se fixe le malonyl-CoA. La condensation aboutit à un $C_6$-β-cétoacyl-ACP qui est réduit, déshydraté puis réduit de nouveau pour former un $C_6$-β-acyl-ACP qui est prêt pour un troisième tour d'élongation. Les cycles d'élongation continuent jusqu'à ce qu'un palmityl-S-ACP soit formé. Ce composé n'est pas un substrat pour l'enzyme condensante, il est hydrolysé en palmitate par la palmityl thioestérase avec libération du thiol central.

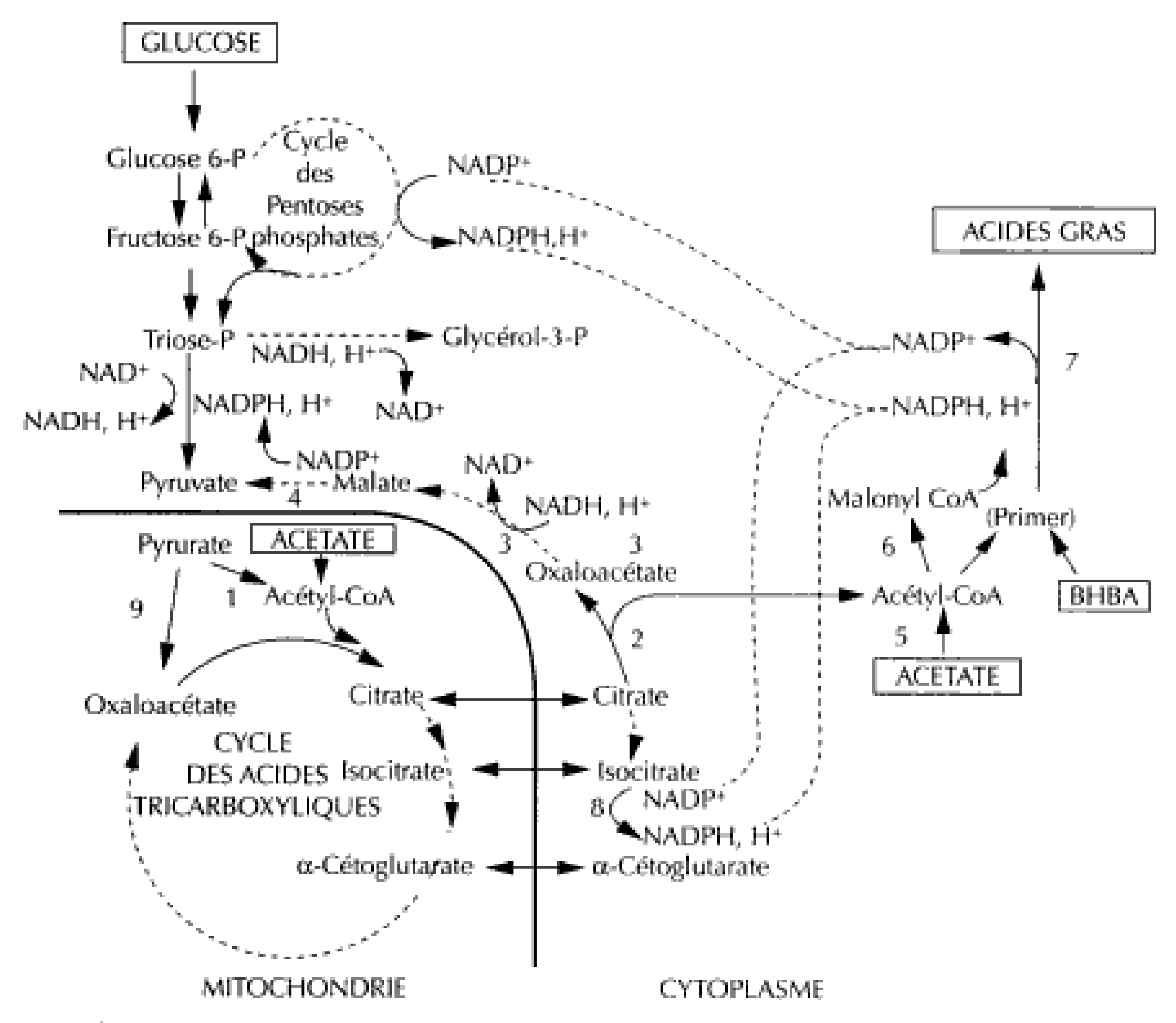
### j) Origine des précurseurs carbonés et du NADP réduit

Les atomes de carbone constituant les acides gras dérivent d'une condensation de chaînons à deux atomes de carbone, l'acétyl-CoA. Ce précurseur provient surtout du pyruvate issu du métabolisme glucidique. La glycolyse cytoplasmique fournit du pyruvate qui pénètre dans les mitochondries où il est transformé en acétyl-CoA par le complexe pyruvate déshydrogénase (*fig. 9*). L'acétyl-CoA ne peut franchir la membrane mitochondriale. Pour la traverser, il se condense avec l'oxaloacétate pour former le citrate, transféré par un système spécifique. Dans le cytosol, il est clivé en oxaloacétate et en acétyl-CoA par la citrate lyase.

On peut observer dans la *figure 9* qu'il existe trois sources de NADPH,H$^+$ nécessaire à la synthèse des acides gras. La plus grande partie provient des réactions d'oxydation propres à la synthèse des pentoses. Les tissus où cette voie est active sont aussi ceux où la lipogenèse est très active. Ces deux voies étant extramitochondriales, il n'existe pas de barrière s'opposant au transfert du NADPH,H$^+$.

La deuxième source de NADPH,H$^+$ provient de la décarboxylation oxydative du malate en pyruvate par l'enzyme malique. Le pyruvate peut entrer dans la mitochondrie. (Le malate, grâce à un transporteur spécifique, peut aussi passer dans la matrice mitochondriale ou la malate déshydrogénase l'oxyde en oxaloacétate.) Ainsi, la sortie d'acétyl-CoA hors de la mitochondrie *via* l'oxaloacétate est couplée à la réduction de NADP aux dépens du NAD réduit d'origine glycolytique, c'est le cycle de Lardy (cycle pyruvate-malate). Le but de ce cycle est de recycler l'oxaloacétate produit dans le cytosol par la réaction citrate-oxaloacétate + acétyl-CoA qui a permis la sortie des unités acétyles à l'extérieur de la mitochondrie.

Oxaloacétate C $\xrightarrow{NAD^+}$ Malate C $\xrightarrow{NADPH,H^+}$ Pyruvate C → Pyruvate M → Oxaloacétate M




1. complexe pyruvate déshydrogénase ; 2. citrate lyase ; 3. malate déshydrogénase ;
4. enzyme malique ; 5. acétyl-CoA synthétase ; 6. acétyl-CoA carboxylase ;
7. complexe acide gras synthétase ; 8. isocitrate déshydrogénase ; 9. pyruvate carboxylase.

**Figure 9.** Interrelations entre métabolismes lipidique et glucidique et origine des précurseurs carbonés et du pouvoir réducteur pour la biosynthèse des acides gras

La troisième source de $NADPH,H^+$ provient de la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en α-cétoglutarate. Il s'agit d'une voie mineure. Ces différents schémas mettent en évidence l'existence d'une relation étroite entre les métabolismes glucidique et lipidique :

- la voie glycolytique produit du pyruvate qui est la source mitochondriale d'acétyl-CoA et des équivalents réducteurs (NADP réduit) dans le cytoplasme pour la synthèse des AG ;
- l'oxaloacétate suit la voie de la gluconéogenèse, mais peut se condenser avec l'acétyl-CoA pour former le citrate : c'est la première étape du cycle de Krebs. Mais le citrate peut également quitter la mitochondrie et être clivé dans le cytoplasme en acétyl-CoA, point de départ de la synthèse des AG ;
- la voie des pentoses phosphates produit les équivalents réducteurs nécessaires à la synthèse des AG.

### k) Contrôle de la synthèse des acides gras

La régulation de la synthèse des acides gras s'effectue à deux niveaux : sur la disponibilité en substrats d'origine glucidique et sur l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase.

### *Disponibilité en substrats d'origine glucidique*

- L'acétyl-CoA qui est issu du pyruvate provenant de la glycolyse.
- L'ATP qui est produit par l'oxydation de l'acétyl-CoA dans le cycle de l'acide citrique.
- Le NADPH,$H^+$ qui provient pour la plus grande part de la voie des pentoses mais aussi, comme nous l'avons vu, du cycle de Lardy et de la décarboxylation oxydative du malate. Il est clair que l'insuline joue un rôle important dans la disponibilité de ces substrats puisqu'elle facilite le transport du glucose dans l'adipocyte et accélère la glycolyse.

### *L'activité de l'acétyl-CoA carboxylase*

Il s'agit de la première étape de la synthèse des acides gras. Il existe deux types de régulations.

#### À court terme

L'activité de l'acétyl-CoA carboxylase est soumise à deux sortes de contrôles :

- *contrôle allostérique* : l'acétyl-CoA carboxylase existe à l'état de protomère enzymatiquement inactif ou à l'état de polymère actif. L'enzyme est régulée de façon allostérique par le citrate qui induit la polymérisation du protomère. La concentration en citrate dépend d'une part de la disponibilité en oxaloacétate et en acétyl-CoA et d'autre part de l'activité de l'isocitrate déshydrogénase. Cette enzyme est soumise à une régulation allostérique par l'ATP et l'AMP. Lorsque la concentration d'ATP est élevée, l'isocitrate déshydrogénase est inactive et l'isocitrate n'est pas métabolisé. La concentration en citrate augmente et active l'acétyl-CoA carboxylase favorisant la lipogenèse. Lorsque le taux d'ATP est bas, l'effet inverse se produit. L'acétyl-CoA carboxylase est inactivée par le malonyl-CoA ou les acyl-CoA à longue chaîne et notamment le palmityl-CoA, produit final de la réaction, entraînant la dépolymérisation de l'enzyme. Il s'agit d'un rétrocontrôle négatif ;

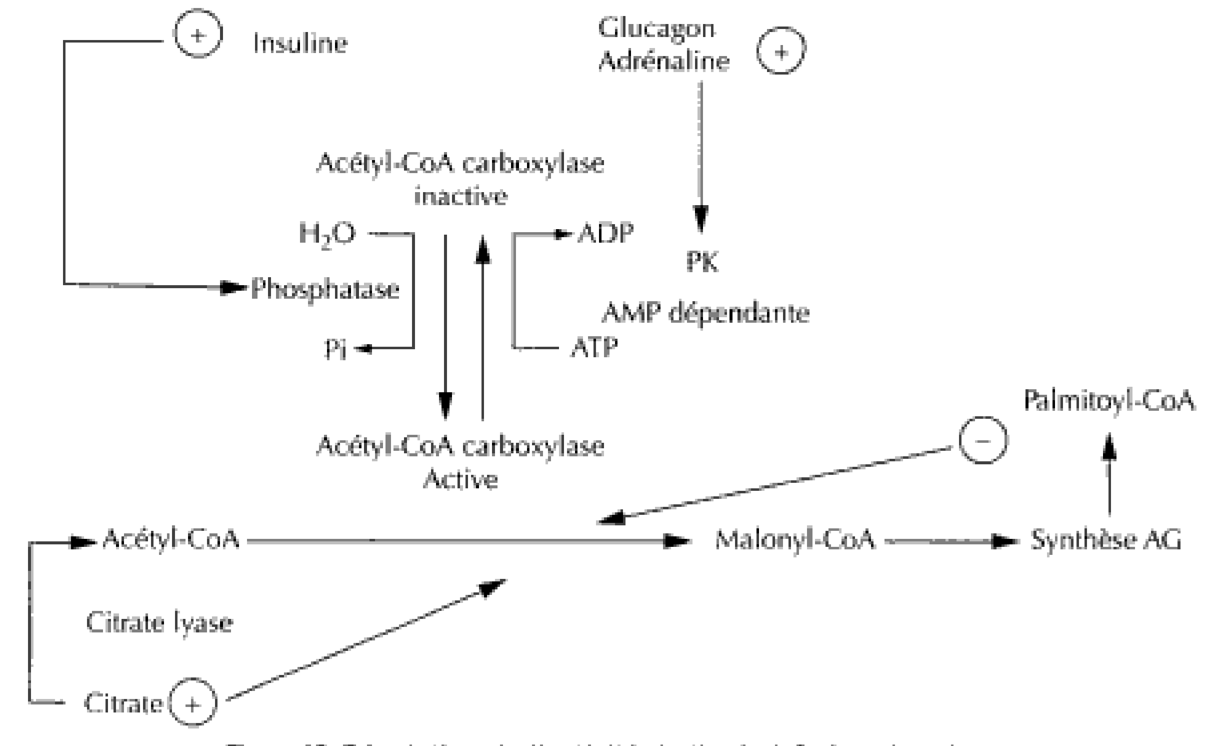



**Figure 10.** Régulation de l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase

• *contrôle par phosphorylation-déphosphorylation* : la forme active de l'enzyme est déphosphorylée. Les trois enzymes catalysant des étapes clés du métabolisme lipidique (acétyl-CoA carboxylase, HMG-CoA réductase, lipase hormonosensible) sont régulées par une protéine kinase commune : l'*AMP-activated protein kinase* (AMP-PK) (*fig. 11*). L'AMP-PK est activée indirectement par les acyl-CoA qui activent une kinase kinase. L'AMP-PK est également régulée par l'AMPc qui active la phosphorylation catalysée par l'AMP-PK. Le glucagon entraînant une augmentation d'AMPc stimule la phosphorylation de l'acétyl-CoA carboxylase la rendant inactive. L'insuline a un effet inverse, *via* la liaison à son récepteur qui active des tyrosines kinases, celles-ci génèrent des seconds messagers qui sont antagonistes de l'AMPc et activent la phosphodiestérase qui catabolise l'AMPc en 5'AMP. Ces deux hormones jouent aussi un rôle indirect sur la lipogenèse. Le glucagon inhibe l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase et diminue ainsi la concentration de malonyl-CoA. Or ce dernier est un inhibiteur de l'acylcarnitine transférase qui permet le transfert des AG dans la mitochondrie pour le catabolisme. Le glucagon stimule indirectement l'orientation des AG vers le catabolisme au moment où il faut fournir de l'énergie pour la gluconéogenèse. De récentes données suggèrent que la régulation de l'expression des gènes lipogéniques par l'insuline et les acides gras polyinsaturés sont médiés par le SREBP-1c (*sterol responsive element-binding protein-1c*), dans les hépatocytes et les adipocytes.

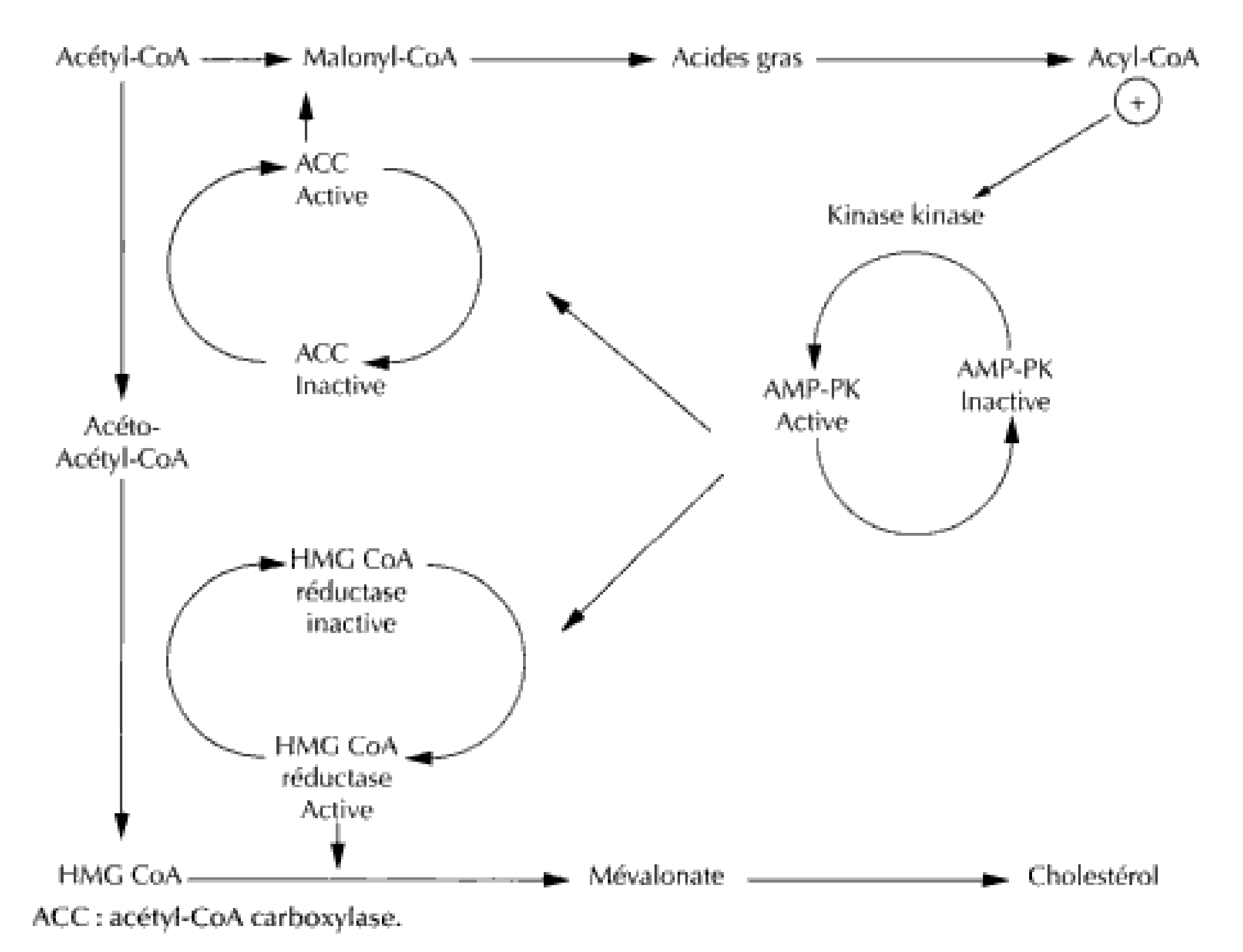



**Figure 11.** Rôle de l'AMP-*activated protein kinase* (AMP-PK)

#### À long terme

Il existe aussi une régulation à long terme qui s'effectue au niveau de différentes enzymes : acétyl-CoA carboxylase, acide gras synthétase, citrate lyase et enzyme malique. La synthèse de ces enzymes, réprimée durant le jeûne, est augmentée quand le glucose est disponible. L'insuline module positivement l'expression du gène de l'acétyl-CoA carboxylase à l'inverse du glucagon.

### 2. Acides gras à nombre impair d'atomes de carbone

Par un processus cytoplasmique, il y a condensation d'un propionyl-CoA (au lieu de l'acétyl-CoA) et du malonyl-CoA. Le propionyl-CoA provient du catabolisme de la valine et de l'isoleucine.

## B. Système mitochondrial

Les acides gras sont transférés dans la mitochondrie par la carnitine. L'allongement est réalisé par des réactions enzymatiques inverses de la β-oxydation à l'exception de la réaction finale qui est catalysée par une réductase à NADPH.

## C. Système microsomial

### 1. Élongation des acides gras

Le produit essentiel de l'acide gras synthétase est le palmitate. Les AG plus longs sont formés par des réactions d'élongation catalysées par des systèmes enzymatiques associés à la membrane du réticulum endoplasmique (connus sous le nom de « systèmes microsomiaux »). Des unités à deux carbones sont ajoutées à l'extrémité carboxylique des acides gras saturés ou non saturés, il s'agit d'unités malonyl-CoA. Dans ce cas, l'ACP ne joue pas le rôle de transporteur. Ce système fournit les AG en C22 mais également les AG polyinsaturés.

### 2. Biosynthèse des acides gras insaturés

Les acides gras saturés (acide stéarique, acide palmitique) peuvent être soit allongés, soit transformés en acides gras monoinsaturés menant à des acides gras non indispensables, les acides oléique et palmitoléique [C18:1 (9)][C16:1 (9)].
On ne leur a attribué jusqu'à présent, ainsi qu'à leurs dérivés polyinsaturés et hautement insaturés, qu'un rôle palliatif structural lors d'une carence en acides gras essentiels. Chez l'homme en situation physiologique, les acides gras polyinsaturés forment un ensemble de douze acides gras qui jouent un rôle essentiel : la famille de l'acide linoléique et celle de l'acide α-linolénique. Seul le monde végétal est capable de synthétiser la double liaison cis en 12 conduisant à l'acide linoléique et la double liaison cis en 15 conduisant à l'acide α-linolénique. Ce sont donc des nutriments indispensables pour les animaux *(fig. 12)*.
Les systèmes microsomiaux peuvent introduire des doubles liaisons grâce à l'intervention de la désaturase et un allongement par unité en C2 (acétyl-CoA) par des

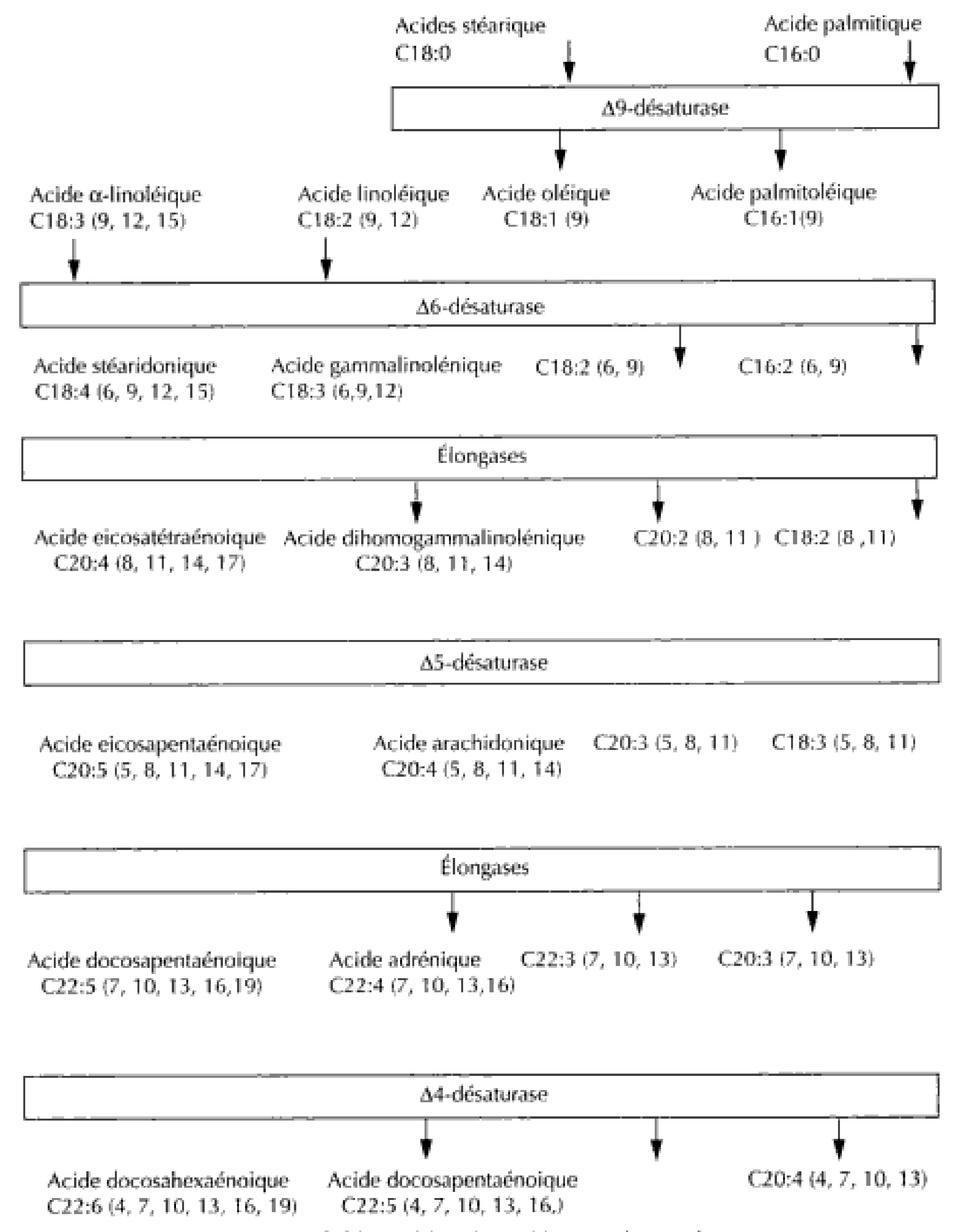



**Figure 12.** Biosynthèse des acides gras insaturés

élongases. Les désaturases ont une spécificité de substrat assez large mais une spécificité de position étroite qui permet de les classer en Δ9, Δ6, Δ5. L'existence de la désaturase en Δ4 est de plus en plus contestée.
Les régulations des différentes désaturases ont été étudiées, notamment celles de la Δ6 et de la Δ9. L'activité de la Δ6 est stimulée par l'insuline. Cette dernière hormone conduit à un hyperfonctionnement de la Δ9 en entraînant une hyperproduction d'acide oléique endogène. En revanche, si le régime est riche en acide oléique, la Δ9 désatu-

rase est bloquée. L'adrénaline, la cortisone et la thyroxine inhibent l'activité de la Δ9 désaturase. Par ailleurs, les désaturases ont une affinité plus grande pour les acides gras les plus longs et les plus désaturés. Un excès d'apport en acide α-linolénique peut inhiber la désaturation de l'acide linoléique, une grande quantité d'acide oléique peut interférer sur la désaturation de l'acide α-linolénique et linoléique.
Les acides gras polyinsaturés (AGPI) contribuent à la constitution des glycérophospholipides de la couche bilipidique des membranes. Ils peuvent être libérés de ces phospholipides sous l'action de diverses phospholipases, essentiellement des phospholipases A2. Cette activité des phospholipases est modulée par le calcium ionisé (activateur) et les lipocortines, protéines inhibitrices dont les actions sont elles-mêmes contrôlées par la protéine kinase C. Les glucocorticoïdes ont un effet anti-inflammatoire lié à une stimulation de la synthèse des lipocortines, inhibant ainsi la libération des AGPI. Ces AGPI sont ensuite soit réincorporés aux phospholipides (PL) membranaires, soit, pour trois d'entre eux, les acides dihomogammalinolénique, arachidonique et eicosapentaénoïque, orientés vers deux voies métaboliques conduisant à des médiateurs lipidiques d'une importance majeure sur le plan des processus immunitaires, les prostaglandines (PGs) et les leucotriènes (LTs). L'acide arachidonique est, sur ce plan, l'acide gras le plus important.
La biosynthèse des PGs et des LTs est conditionnée, au niveau des membranes qui viennent de libérer ces trois AGPI, par l'activité de deux systèmes enzymatiques, les voies des cyclo-oxygénases et lipo-oxygénases, réparties de façon spécifique au niveau de chaque tissu, ce qui explique les différences de capacité de synthèse de ces médiateurs chimiques selon les cellules. Schématiquement, la voie initiée par les cyclo-oxygénases conduit aux prostaglandines :

- PGE1, PGF1, thromboxane A2, à partir de l'acide dihomogammalinolénique ;
- PGE2, PGF2, PGD2, PGI1, thromboxane A2, à partir de l'acide arachidonique ;
- PGE3, PGF3, PGD3, PGI3, thromboxane A3, à partir de l'acide eicosapentaénoïque.

Deux voies lipo-oxygénasiques, la 12-lipo-oxygénase et la 5-lipo-oxygénase, conduisent à une série de produits actifs, les leucotriènes. Différents selon l'AGPI qui leur a donné naissance, les LTs les plus importants sur le plan de l'immunité sont le LTB4, synthétisé à partir de l'acide arachidonique, et le LTB5, formé à partir de l'acide eicosapentaénoïque.

## VI. Métabolisme des acides gras et des triglycérides en fonction de l'état nutritionnel

Le métabolisme des acides gras et des triglycérides dans l'hépatocyte et l'adipocyte est déterminé par l'état nutritionnel. En période postprandiale, la charge glucidique et la hausse du rapport insuline-glucagon déclenchent la synthèse des acides gras. L'augmentation de la concentration de malonyl coenzyme A, inhibiteur de la carnitine acyltransférase I, freine l'entrée des acyl coenzymes A dans la mitochondrie : ainsi la synthèse des acides gras s'oppose à leur dégradation par β-oxydation. Durant cette période, les acides gras sont transportés du foie vers les tissus adipeux pour être mis en réserve sous forme de triglycérides. Dans les états de jeûne, la syn-

thèse des acides gras est inhibée. Les triglycérides, mis en réserve dans le tissu adipeux, sont dégradés. Les acides gras et le glycérol sont libérés dans le sang. Ces acides gras rejoignent les tissus consommateurs d'acides gras (muscle et myocarde). Ces acides gras d'origine lipolytique (libérés sous l'action de la baisse du rapport insuline-glucagon) inhibent, sous la forme d'acyl-CoA, l'acétyl-CoA carboxylase. Il y a donc une levée d'inhibition du malonyl-CoA sur la carnitine palmitoyltransférase I, ce qui accélère l'entrée des acyl-CoA dans la mitochondrie où ils subiront la β-oxydation. Dans le foie, l'augmentation de la β-oxydation des acides gras, provenant du tissu adipeux, entraîne une augmentation de l'acétyl-CoA disponible pour la synthèse des corps cétoniques. Ces derniers sont utilisés dans les tissus périphériques comme source énergétique. Le glycérol est utilisé pour la gluconéogenèse. Le fructose 1,6-diphosphate lève l'inhibition de l'acide gras synthétase produite par le NADPH au cours du jeûne.

## L'essentiel de la question

Les acides gras sont des acides carboxyliques à longues chaînes aliphatiques. L'acétyl coenzyme A est le métabolite clé. En effet, le catabolisme par β-oxydation des acides gras aboutit à l'acétyl coenzyme A et sa synthèse est réalisée à partir de celui-ci. Il existe ensuite des réactions d'élongation ou de désaturation. Les acides gras ont trois rôles essentiels : structural (composition des phospholipides et glycolipides membranaires), fonctionnel (des dérivés des acides gras sont des modulateurs ou messagers cellulaires [leucotriène, diacylglycérol]) et énergétique. Ils sont sources d'énergie dans la plupart des tissus mais surtout dans les muscles et le myocarde. Les acides gras cellulaires proviennent soit des triglycérides des lipoprotéines, par hydrolyse grâce aux lipoprotéines lipases, ou par hydrolyse des triglycérides du tissu adipeux par la triglycéride lipase. Ces acides gras subissent ensuite la β-oxydation, ou hélice de Lynen, qui est une voie catabolique oxydative (par transfert des atomes d'hydrogène sur les NAD et coenzyme Q) aérobie pour aboutir à de l'acétyl coenzyme A. Il s'agit d'une voie mitochondriale. Les acides gras à longue chaîne sont catabolisés dans les peroxysomes.
La synthèse des acides gras est impossible par simple réaction réversible de l'hélice de Lynen. Il existe trois mécanismes de synthèse différents selon sa localisation : la synthèse cytosolique à partir de l'acétyl coenzyme A jusqu'à C16, l'élongation mitochondriale et l'élongation et/ou désaturation microsomales. Le substrat de la synthèse cytosolique est l'ATP, l'acétyl coenzyme A, qui provient surtout de la glycolyse et le NADPH,$H^+$ venant de la voie des pentoses et du cycle de Lardy (pyruvate-malate). L'enzyme clé est l'acétyl coenzyme A carboxylase. Cette enzyme est régulée par un contrôle allostérique dont l'activateur principal est le citrate et par un contrôle sous la dépendance d'enzymes phosphorylantes (inactivation) ou déphosphorylantes (activation). L'insuline active directement cette enzyme en activant la déphosphorylation. Le glucagon a l'effet inverse.
Les triglycérides sont des esters d'acides gras et de glycérol. La synthèse des triglycérides est réalisée à partir d'acides gras et de glycérols préalablement activés et le catabolisme aboutit à des acides gras et du glycérol. Les triglycérides ont trois rôles essentiels pour les acides gras. Il s'agit de la forme d'apport alimentaire, de transport plasmatique et de stockage intracellulaire.

Le métabolisme des triglycérides a lieu dans l'intestin, le tissu adipeux, le foie, les muscles et le myocarde. La synthèse des triglycérides nécessite deux substrats : les acides gras activés en acyl coenzyme A et le glycérol. Ce dernier est actif sous forme de deux monoglycérides dans l'entérocyte et de glycérol 3-phosphate dans les autres tissus. Celui-ci provient de la phosphorylation du glycérol ou de la réduction du dihydroxyacétone phosphate.
Il existe trois enzymes intervenant dans le métabolisme des triglycérides : la lipase pancréatique, intervenant dans l'hydrolyse des triglycérides alimentaires, la lipoprotéine lipase hydrolysant les triglycérides circulant transportés par les chylomicrons ou les VLDL et la lipase hormonosensible (triglycéride lipase) cellulaire dont l'activité est contrôlée par les hormones.
L'intestin est un lieu de production des triglycérides exogènes, après l'hydrolyse des triglycérides alimentaires par la lipase pancréatique. Les acides gras entérocytaires permettent la néosynthèse de triglycérides qui seront incorporés dans les chylomicrons. Le tissu adipeux stocke sous forme de triglycérides les acides gras provenant des chylomicrons ou VLDL qui ont subi l'action de la lipoprotéine lipase. En fonction des besoins, il y a resynthèse de triglycérides ou lipolyse par la lipoprotéine lipase hormonosensible. Cela permet de redistribuer les acides gras vers les tissus consommateurs, muscles et myocarde, qui les utilisent comme substrats énergétiques.

***Pour en savoir plus***

- Wanders R.J., Van Grunsven E.G., Jansen G.A. Lipid metabolism in peroxisomes : enzymo logy, functions and dysfunctions of the fatty acid alpha- and beta-oxydation system in human. *Biochem. Society Transactions*, 2000 ; 28 : 141-9.
- Saleh J., Sniderman A.D., Cianflone K. Regulation of plasma fatty acid metabolism. *CCA*, 1999 ; 286 : 163-80.
- Large V., Peroni O., Letexier D. *et al.* Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab*, 2004 ; 30 : 294-309.
- Legrand P. Données récentes sur les désaturases. *Cah Nutr Diet*, 2003 ; 38 : 376-83.

# Régulation de la biosynthèse du cholestérol

C. AUSSEL, Laboratoire de biologie, Hôpital Émile Roux, AP-HP, Limeil-Brévannes.

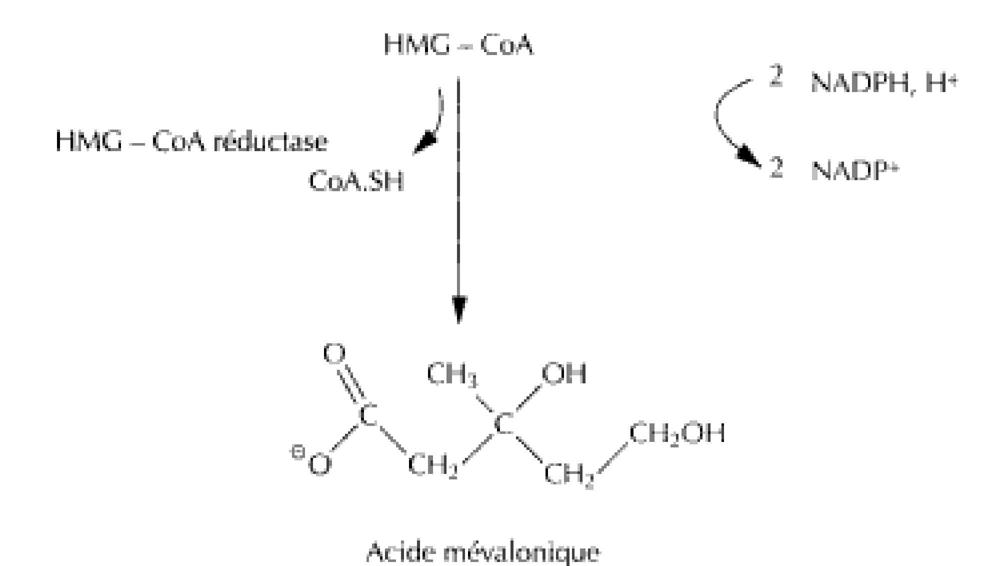
*Le cholestérol assure plusieurs fonctions biologiques capitales, il s'agit du précurseur des acides biliaires, des hormones stéroïdes de la vitamine $D_3$ et il participe à la structure des membranes cellulaires.*
*Le cholestérol de l'organisme des animaux supérieurs provient soit d'un apport exogène (100 à 500 mg par jour) soit, pour la plus grande part (700 à 900 mg), d'une synthèse de novo à partir de l'acétate. L'enzyme clef régulant la synthèse du cholestérol est la β-hydroxy-β-méthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase.*
*Le cholestérol n'est pas hydrosoluble. Il circule dans le sang sous forme libre ou estérifiée par un acide gras, toujours au sein d'une lipoprotéine. Le cholestérol est transporté par tous les types de particules lipoprotéiques. Cependant, environ 70 % du cholestérol plasmatique est transporté par les lipoprotéines de basse densité (LDL, low density lipoprotein), le reste est contenu dans les lipoprotéines de très faible (VLDL, very low density lipoprotein) et surtout de haute densité (HDL, high density lipoprotein). La cholestérolémie d'un individu sain est stable, elle dépend de la concentration plasmatique en LDL. La compréhension des facteurs qui modulent les deux principaux processus de renouvellement du cholestérol, biosynthèse et transformation en acide biliaire, est encore incomplète.*

# I. Synthèse du cholestérol

La synthèse du cholestérol s'effectue dans toutes les cellules de l'organisme mais seul l'intestin et le foie contribuent de façon quantitative au cholestérol circulant. La voie de synthèse du cholestérol produit aussi en faibles quantités des radicaux prénoïdes : isopentényl, géranyl et farnésyl et des dérivés de ces radicaux (ubiquinone). La synthèse est cytoplasmique. Tous les atomes de carbone du cholestérol sont issus de l'acétate qui provient essentiellement de l'acétyl-CoA du métabolisme glucidique. Les acides gras à chaîne courte (C8), les corps cétoniques et la leucine sont aussi des substrats pour la synthèse de cholestérol. La première phase de la synthèse conduit à la production de 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA). L'étape suivante, la synthèse de mévalonate, est catalysée par la HMG-CoA réductase. Il s'agit de l'étape limitante de la synthèse de cholestérol. Cette réaction est irréversible. Toutefois, des travaux récents ont montré que le retour du mévalonate en HMG-CoA était possible. En effet, dans le tissu nerveux, une voie mineure (cycle de Popjak) permet de resynthétiser l'HMG-CoA à partir du diméthylallylpyrophosphate (DMPP). Les étapes intermédiaires de la voie de synthèse, jusqu'au farnésyl pyrophosphate, conduisent aux synthèses des radicaux isopentényl et farnésyl et des isoprénoïdes ou terpénoïdes (ubiquinone). Les synthèses des stérols (cholestanol, vitamine D et cholestérol) débutent à partir de squalène.

# II. Métabolisme du cholestérol

Le métabolisme du cholestérol est complexe. Il existe des échanges interorganes, les lipoprotéines servant de transporteur. Le cholestérol s'échange entre les diverses lipoprotéines et également entre les lipoprotéines et les différentes cellules de l'organisme. La *figure 1* met en évidence les échanges dynamiques du cholestérol



Acide mévalonique

entre les différents organes. Le plasma constitue le compartiment central et les organes les différents compartiments périphériques. Le foie joue un rôle clé car il effectue la synthèse du cholestérol et est l'organe exclusif de la transformation du cholestérol en acides biliaires Ceux-ci sont ultérieurement conjugués à la taurine et à la glycine dans les peroxysomes. L'intestin grêle, autre organe essentiel de la synthèse du cholestérol, représente le site spécifique de l'absorption du cholestérol alimentaire ou biliaire.

Au plan hépatique, dans les périodes postprandiales, la synthèse du cholestérol est réalisée à partir des hydrates de carbone. Le cholestérol est incorporé aux lipoprotéines de très faible densité contenant l'apoprotéine B100. Les VLDL sont sécrétées dans la circulation où elles subissent une dégradation rapide par les lipoprotéines lipases activées par les apo CII présentes à la surface des VLDL. L'hydrolyse des triglycérides induit des modifications structurelles conduisant au départ des apolipoprotéines C. Des édifices plus petits, enrichis en apo B100 et E en ester de cholestérol apparaissent. Ce sont les résidus ou *remnants* de VLDL ou lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL, *intermediate density lipoprotein*). Deux voies métaboliques transforment les IDL :

- voie des récepteurs : une grande quantité d'IDL formée est internalisée et dégradée dans le foie *via* les récepteurs B/E (récepteur LDL) ;
- voie de la lipase hépatique : des quantités plus faibles de particules IDL sont dégradées dans la circulation par la lipase hépatique qui transforme les IDL en LDL.

La reconnaissance des LDL par leurs apo B100 se fait au niveau du foie mais aussi de l'ensemble des cellules de l'organisme qui possèdent le récepteur spécifique. Nous verrons que l'entrée du cholestérol dans les cellules par le biais des LDL entraîne une régulation de sa synthèse.

Dans le domaine intestinal, le cholestérol alimentaire ou biliaire est absorbé par les entérocytes qui incorporent le cholestérol dans les chylomicrons. Ceux-ci, *via* la lymphe, se retrouvent dans la circulation, ils subissent l'action de la lipoprotéine lipase, perdent les triglycérides et se détachent pour former des HDL naissantes discoïdales. Les édifices résiduels enrichis en apo 48 et E se reforment autour des esters de cholestérol et des molécules restantes des triglycérides. Ces résidus des

chylomicrons riches en cholestérol sont captés par le foie grâce à un récepteur spécifique qui reconnaît l'apo E présente à la surface des chylomicrons. La majorité du cholestérol arrive au foie par cette voie. Le foie récupère également le cholestérol excédentaire des tissus périphériques. Les HDL discoïdales peuvent s'enrichir en cholestérol qu'elles soustraient aux cellules périphériques. Le cholestérol libre est estérifié par la lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT) activée par l'apo A1. Le cholestérol estérifié migre au centre des édifices transformant ceux-ci en HDL3. Les HDL3 captent aussi les molécules de cholestérol membranaire pour se transformer en HDL2. Les HDL2 sont pour la plupart reconnues et dégradées dans le foie par des récepteurs aux apo A1 présentes dans la structure des HDL. Il s'agit du transport *reverse* ou inverse du cholestérol (RTC, reverse cholesterol transport).
Au plan hépatique, le cholestérol est soit remis en circulation soit excrété dans la bile directement ou après transformation en acides biliaires. La cholestérol 7α-mono-oxygénase est la première enzyme intervenant dans la dégradation du cholestérol en acide biliaire. Elle est soumise à une régulation. Les niveaux de transcription et d'activité de cette enzyme sont contrôlés par les sels biliaires les plus hydrophobes, comme le glycodésoxycholate, et par le cholestérol. Le taux de transcription de l'enzyme est accru par le cholestérol d'origine alimentaire. L'activité de l'enzyme est stimulée par le cholestérol non estérifié des HDL.

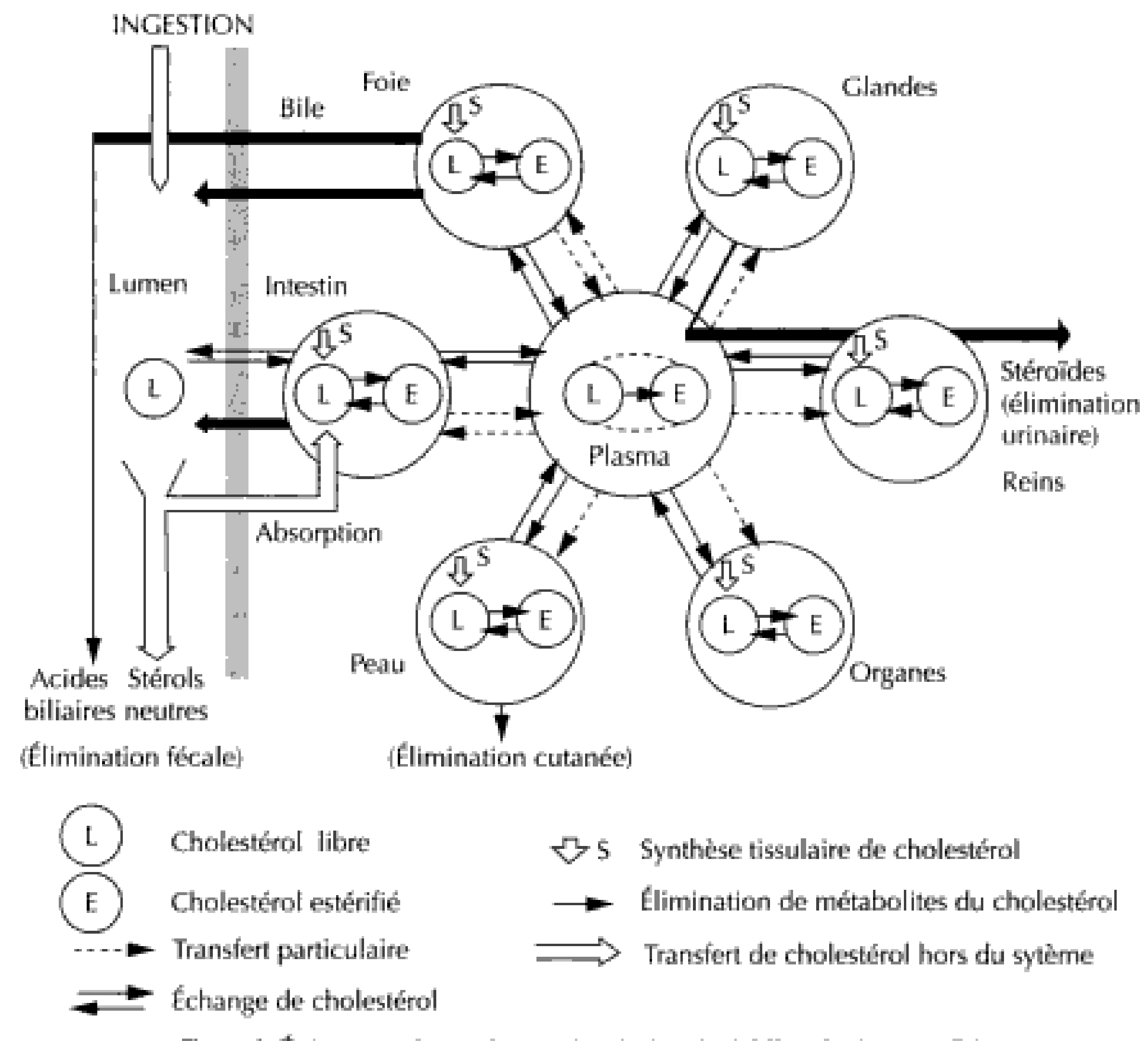



**Figure 1.** Échanges dynamiques du cholestérol (d'après Lutton C.)

La bile est la principale source d'excrétion du cholestérol de l'organisme, et ce sont les sels biliaires qui maintiennent le cholestérol en solution dans la bile. Lorsque le cholestérol se trouve en trop grande quantité, il peut se cristalliser, empêchant la bile de sortir. La régulation de la synthèse des acides biliaires est donc essentielle. Elle met notamment en jeu des protéines de transport intracellulaire du cholestérol et des récepteurs nucléaires. La régulation du trafic du cholestérol dans la cellule est assurée par des protéines de transport comme les SCP2 (*sterol carrier protein* 2). Ces protéines sont localisées dans le peroxysome : elles permettent le transport du cholestérol vers les canalicules biliaires des hépatocytes. Les récepteurs nucléaires aux oxystérols ou *liver X receptor* (LXR) jouent un rôle important dans la régulation des voies métaboliques contrôlant la dégradation cellulaire du cholestérol en aides biliaires. Notamment lors d'un excès d'acides biliaires, le récepteur farnesoïde X ou FXR stimule l'expression hépatique de BSEP (*bile salt export pump*), qui est le principal système d'élimination des acides biliaires dans le canalicule biliaire.

## III. Régulation de la biosynthèse du cholestérol

L'hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase (HMG-CoA réductase) est l'enzyme qui régule la synthèse endogène du cholestérol. La diminution de son activité cellulaire par rétrocontrôle négatif permet de réduire la synthèse de cholestérol endogène. Plusieurs mécanismes physiologiques contrôlent l'activité de cette enzyme.

### A. À court terme dans le foie

Elle intervient surtout au niveau hépatique. Il s'agit d'une régulation complexe. La durée de vie de l'HMG-CoA réductase est courte (trois ou quatre heures) et sa concentration cellulaire est très variable (une à deux cents fois). Elle résulte de réactions de phosphorylation-déphosphorylation de l'enzyme. L'HMG-Co réductase, inactive à l'état phosphorylé, est activée par déphosphorylation sous l'action d'une réductase phosphatase (*fig. 2*).

Ce système implique une réductase kinase spécifique. La forme phosphorylée de cette kinase, seule active, est contrôlée par une réductase kinase kinase et une réductase kinase phosphatase.

Ce système est sensible au glucagon et à l'insuline. Le glucagon, *via* une protéine kinase AMP cyclique dépendante, active un inhibiteur de phosphatase qui, agissant à trois niveaux, diminue l'activité de la HMG-CoA réductase. Ainsi le glucagon, en favorisant la formation de la forme inactive de la HMG-CoA réductase, diminue la vitesse de synthèse du cholestérol. L'insuline a un effet opposé. C'est un système très rapide, l'activité de la réductase s'élève en période postprandiale et diminue en période de jeûne.

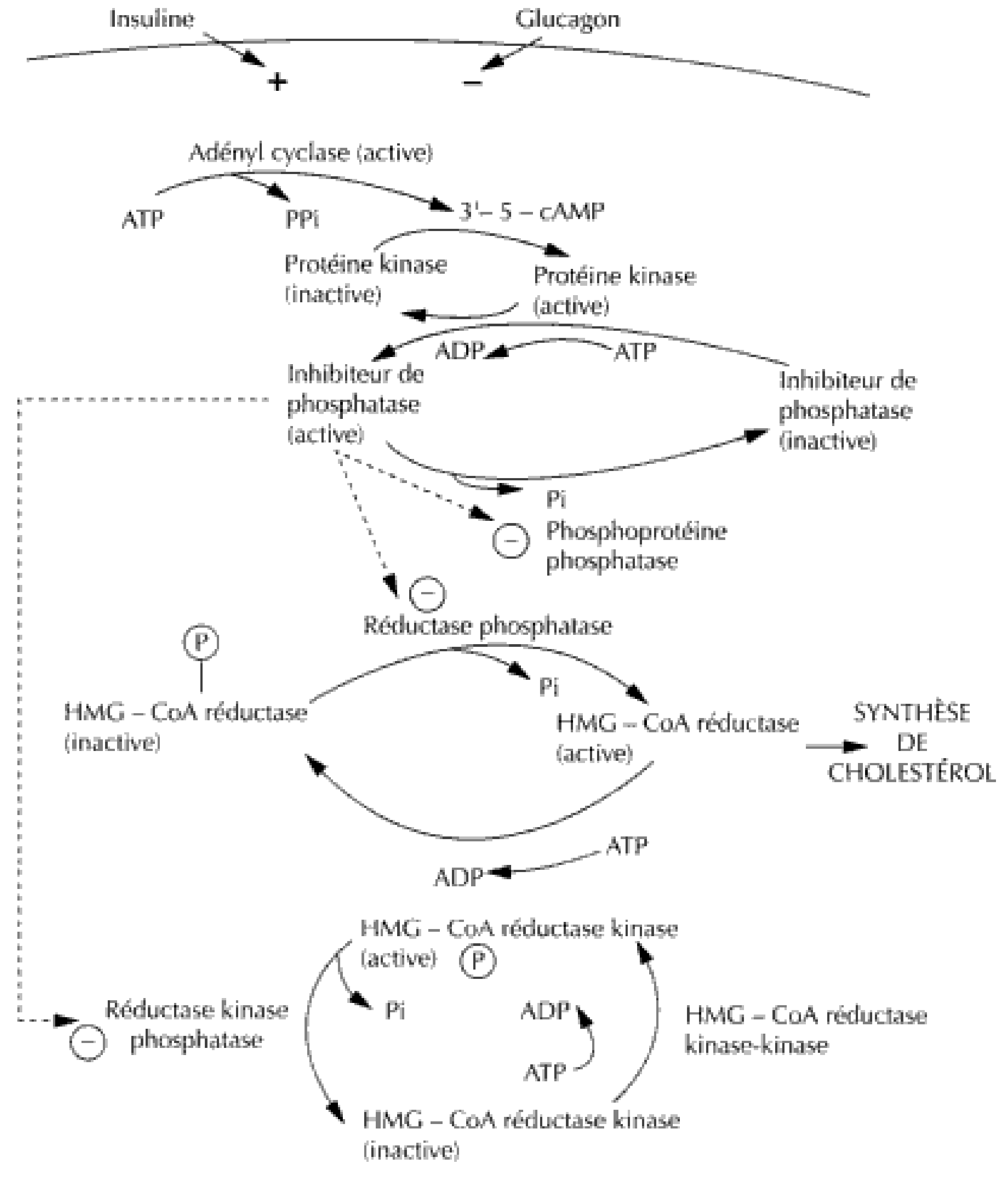



**Figure 2.** Régulation de l'hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase

## B. À long terme dans les tissus périphériques

Le cholestérol et les oxystérols répriment la synthèse des gènes de cette voie métabolique à 80 % environ. Le mévalonate, quant à lui, peut presque totalement inactiver l'activité restante. Le cholestérol inhibe l'HMG-Co réductase en laissant une activité résiduelle permettant la synthèse des dérivés isoprénoïdes qui sont indispensables au cycle cellulaire.

La régulation de la synthèse des enzymes qui contrôlent la synthèse du cholestérol est faite par induction. Les SREBP1 et 2 (*sterol regulatory element-binding protein)* sont des protéines localisées sur la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique et sur l'enveloppe cellulaire. Il s'agit de facteurs de transcription des gènes qui participent à la régulation de la concentration cellulaire en cholestérol. La partie $NH_2$ terminale des SREBP1 et 2 est libérée dans le cytosol par l'intermédiaire d'une protéase

quand les concentrations cellulaires en cholestérol sont basses. Le facteur transrégulateur ainsi libéré est transporté dans le noyau où il se lie à l'élément cis-régulateur correspondant. Il y a alors stimulation de la transcription des gènes cibles. L'élément cis-régulateur est présent dans le promoteur de l'HMG-CoA réductase et l'HMG-Co synthase ainsi que dans celui du récepteur des LDL permettant la captation du cholestérol extracellulaire. Le cholestérol, au contraire, inhibe la libération de SREBP1 et 2. Par ailleurs, le cholestérol augmente la dégradation de l'HMG-CoA réductase. Il semble que l'élévation du cholestérol membranaire augmenterait la formation des agrégats d'HMG-CoA réductase, stade qui favorise sa dégradation.

Ces phénomènes interviennent lors de l'internalisation des molécules de LDH qui livre le cholestérol aux cellules. La *figure* 3 met en évidence les autres mécanismes qui apparaissent lors de l'internalisation des molécules de LDH. Ces mécanismes de régulation permettent de garder constante la concentration cellulaire en cholestérol non estérifié. Le cholestérol active l'acyl-CoA cholestérol acyltransférase (ACAT), enzyme estérifiant le cholestérol. Le cholestérol en excès est engrangé sous forme d'ester de cholestérol dans la cellule, forme moins toxique que le cholestérol libre.

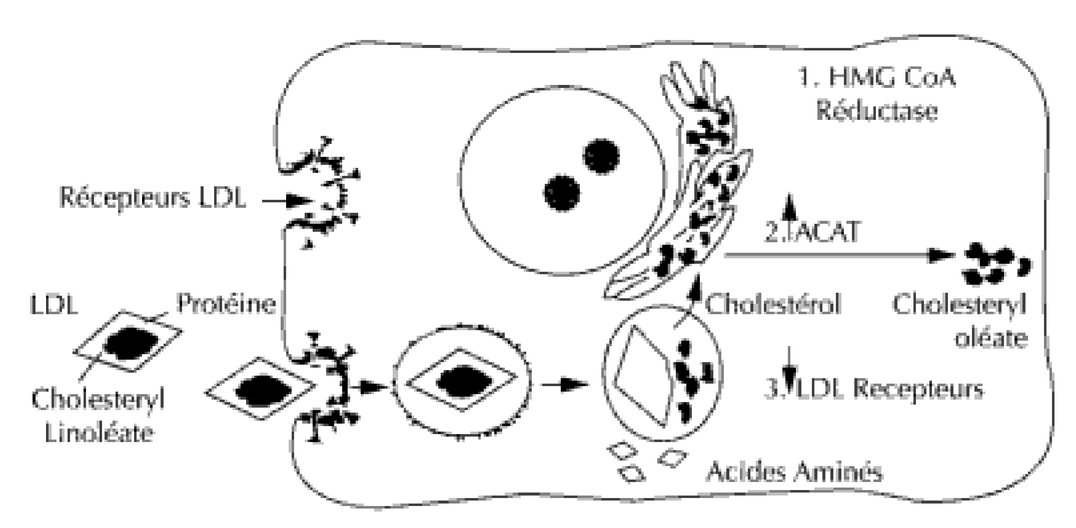



**Figure 3.** Contrôle de la concentration intracellulaire de cholestérol après internalisation des LDL

Le cholestérol contrôle son entrée dans la cellule en inhibant la synthèse des récepteurs des HDL. Cette action a pour but de prévenir une surcharge cellulaire en cholestérol. Ainsi, la pénétration du cholestérol à l'intérieur de la cellule entraîne une série de rétrocontrôles métaboliques visant à protéger la cellule d'une surcharge éventuelle. Quand les lipoprotéines sont accessibles, les cellules utilisent de préférence le cholestérol fourni par la voie des récepteurs et la synthèse *de novo* est inhibée par rétrocontrôle. L'alimentation joue un rôle important dans la régulation de la biosynthèse du cholestérol. Une alimentation riche en cholestérol entraîne une augmentation des concentrations plasmatiques des LDL. En effet, parallèlement à la diminution de l'activité HMG-CoA réductase, ce type d'alimentation entraîne une diminution des récepteurs des LDL. Leur catabolisme étant réduit, leur concentration plasmatique augmente. Les LDL séjournent plus longtemps dans le plasma puisque leur durée de demi-vie est augmentée. Elles sont modifiées, surtout oxydées par des radicaux libres, et sont alors reconnues par un autre récepteur (dit « *scavenger* ») différent du récepteur apo B qui se situe au niveau de la

membrane des macrophages. Ce récepteur n'est pas régulé par l'apport intracellulaire en cholestérol. Les LDL oxydées pénètrent dans le macrophage et subissent toutes une suite de réactions aboutissant au dépôt intracellulaire de cholestérol estérifié et finalement à la transformation du macrophage en cellule spumeuse, base de la lésion d'athérosclérose. Il est connu également que l'apport alimentaire en acide gras saturés augmente la cholestérolémie à la différence des acides gras polyinsaturés de la famille des oméga 3 (également notés « ω3 »). La cholestérolémie dépend aussi de son catabolisme qui est contrôlé par la 7α-hydroxylase, enzyme clé de la dégradation du cholestérol en acides biliaires et par le taux de réabsorption des sels biliaires par le cycle entérohépatique. D'un point de vue thérapeutique, il existe des inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase. Ils présentent une similitude structurale avec l'HMG-CoA, substrat physiologique de l'enzyme au niveau de leur chaîne latérale. Ils agissent par inhibition spécifique et compétitive vis-à-vis de l'enzyme avec une affinité très supérieure à celle de l'HMG-CoA. Cette inhibition bloque la synthèse endogène de cholestérol à un stade très précoce de sa chaîne métabolique. La conséquence finale de cette inhibition sur la synthèse endogène du cholestérol au niveau hépatique est l'augmentation de la synthèse des récepteurs des LDH avec un rétablissement de la voie catabolique normale de ces lipoprotéines conduisant à un effet hypocholestérolémiant.

## L'essentiel de la question

La synthèse du cholestérol est énergiquement coûteuse et l'excès de cholestérol dans le sang est à l'origine de dépôts de cholestérol dans la paroi des artères, d'où la nécessité d'une régulation de la cholestérolémie. Cette régulation existe sous deux formes :

- à court terme dans le foie, la vitesse de synthèse du cholestérol est fonction de l'activité de l'HMG-CoA réductase ;
- la phosphorylation, catalysée par l'HMG-Co réductase kinase, inactive l'enzyme, la déphosphorylation catalysée par une phosphatase active l'enzyme ;
- à long terme dans les tissus périphériques : quand la concentration cellulaire en cholestérol augmente (apportée par les LDL), elle entraîne plusieurs conséquences :
  - *une diminution du taux de synthèse* de l'HMG-CoA réductase, qui ralentit la synthèse du cholestérol, et des récepteurs de LDL qui diminuent la captation du cholestérol à partir du sang circulant,
  - *une augmentation du taux de synthèse* de l'acétyl-CoA cholestérol acyltransférase, ce qui accélère l'estérification du cholestérol et donc son stockage.

***Pour en savoir plus***


- Lambert G., Sinal C. J. *Régulation du métabolisme du cholestérol et des acides biliaires par les récepteurs nucléaires LXR et FXR*. Paris, Flammarion Médecine-Sciences 2000, 16 : 1456-8.
- Brown M. S., Goldstein J.-L. The SREBP pathway regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 1997 ; 89 : 331-40.

# Bases fondamentales des cinétiques enzymatiques

D. BIOU
Laboratoire de biochimie générale, Faculté de pharmacie, Paris-XI.
Laboratoire de biochimie-hormonologie, Hôpital Robert Debré, AP-HP Paris.

*La fonction biologique d'une enzyme, désignée aussi par le terme « activité enzymatique » (AE), est de catalyser une réaction chimique spécifique. Comme pour toute catalyse, la réaction chimique est accélérée dans les deux sens d'un même facteur (# $10^{+6}$ à $10^{+11}$), puisque la constante d'équilibre K'eq demeure inchangée. Dans certaines conditions bien définies, dites « conditions conventionnelles », le travail de catalyse effectué par l'enzyme est en relation directe avec la concentration en travailleurs, c'est-à-dire en molécules d'enzyme $(E)_t$. En cinétique enzymatique, ce travail est mesuré par la vitesse initiale $v_0$ de la réaction catalysée, reliée à la concentration en travailleurs par la relation $v_0 = K.(E)_t$. Dans d'autres circonstances, également bien définies, la vitesse initiale est proportionnelle à la concentration en substrat de sorte que $v_0 = K'.(S)_0$. On constate ainsi que les applications biomédicales de la cinétique enzymatique en conditions de vitesse initiale peuvent être multiples : mesure de $(E)_t$ ou de $(S)_0$. Le pharmacien biologiste ou industriel est aussi concerné par les applications de l'enzymologie à la conception de médicaments comme inhibiteurs d'enzyme. Ce chapitre vise à définir les concepts de base indispensables pour comprendre toutes ces applications. En ce sens, il apparaît indispensable à la bonne compréhension des chapitres consacrés à la mesure d'une activité enzymatique et aux réactifs enzymatiques.*

# I. Étude d'un modèle simple : en conditions de vitesse initiale

## A. Formalisation mathématique

### 1. Modèle simplifié d'Henri (1903), Michaelis et Menten (1913)

L'équation d'Henri-Michaelis-Menten (HMM) est démontrée à partir d'un modèle enzymatique simplifié et des *hypothèses suivantes* :

- *Hypothèse 1* : *réaction réversible* avec un seul substrat S, un seul produit P et un seul complexe intermédiaire enzyme-substrat ES.

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} (ES) \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} E + P \quad (1)$$

NB : en réalité, la plupart des enzymes réagissent avec plusieurs substrats ou produits pour former plusieurs composés intermédiaires ES… EP…

- *Hypothèse 2* : *conditions de vitesse initiale.* Si on se place au temps t = 0 dans le sens aller – conditions de vitesse initiale aller, en pratique et par approximation, on considère que le substrat consommé Δ(S) doit être inférieur à 5 % de $(S)_0$ –, seuls E et S sont en présence. On peut donc négliger (P) et la réaction retour $k_{-2}$(E)(P).

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} (ES) \xrightarrow{k_2} E + P \quad (2)$$

La vitesse initiale $v_0$ de la réaction peut être définie à partir de la cinétique de disparition du substrat ou d'apparition du produit comme la pente de la tangente à la courbe pour $t \to 0$ :

$$v_0 = -\frac{d(S)}{dt} = +\frac{d(P)}{dt} \quad (3)$$

NB : si la cinétique est linéaire pendant un intervalle de temps $\Delta t$ (*fig. 2*), cela signifie que les conditions de $v_0$ sont respectées pendant cet intervalle.

- *Hypothèse 3 : équilibre rapide entre E, S et ES.* C'est le cas le plus fréquent et cela signifie que la vitesse de dissociation de ES en E et S est beaucoup plus rapide que la vitesse de la transformation catalytique de ES en E et P ($k_{-1} \gg k_2$). Le complexe ES est en équilibre instantané avec E et S :

$$K_d = \frac{(E)(S)}{(ES)} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (4)$$

- L'étape catalytique étant l'étape lente et limitante, on peut écrire :

$$v_0 = -\frac{d(S)}{dt} = +\frac{d(P)}{dt} = k_2(ES) \quad (5)$$

- La constante $k_2$ regroupe toutes les constantes de vitesse des étapes intermédiaires entre ES et E + P qui ne figurent pas dans le schéma. Pour cette raison, elle est aussi dénommée « constante catalytique $k_{cat}$ ». La constante catalytique $k_{cat}$ n'est assimilable à $k_2$ que dans le modèle simple ci-dessus. Pour les réactions à plusieurs substrats, $k_{cat}$ est une expression algébrique plus ou moins complexe des différentes constantes de vitesse intervenant dans la transformation catalytique, mais sa signification reste la même que celle de $k_2$ dans l'*équation 5*.

*NB* :
- $k_{-1}$ et $k_2$ sont des constantes de vitesse de premier ordre. Leur dimension est celle d'une vitesse/concentration, donc d'un temps$^{-1}$ (min$^{-1}$, sec$^{-1}$) ;
- $k_1$ est une constante de vitesse de deuxième ordre. Sa dimension est celle d'une vitesse/(concentration)$^2$, donc d'une concentration$^{-1}$.temps$^{-1}$ e.g., mol$^{-1}$.L.min$^{-1}$ ;
- la constante de dissociation $K_d$ a la dimension d'une concentration et son inverse, la constante d'affinité $K_A$ a celle d'une concentration$^{-1}$.

- *Hypothèse 4* : $(S)_0 >> (E)_t \Rightarrow (S) = (S)_0 - (ES) \neq (S)_0$, puisque $(ES) \leq (E)_t$. Cela signifie qu'en début de réaction (conditions de vitesse initiale), on peut assimiler (S) libre à $(S)_0$ : $(S)_T \simeq (S)_0$. Pour toutes les équations de cet article, (S) prend la signification de $(S)_0$.

*NB* : cette simplification, acceptable pour une grande part des cinétiques enzymatiques, est parfois impossible, car la concentration locale en ligand *in vivo* (substrat, inhibiteur, hormone ou médicament) peut être du même ordre de grandeur que celle de la protéine cible (enzyme, récepteur). Il faut donc refaire les raisonnements en respectant l'égalité $(S) = (S)_0 - (ES)$.

## 2. Démonstration type à partir de ces hypothèses (et généralisable à des systèmes plus complexes)

- La *démarche* est la suivante :
- écrire la réaction globale reliant S à P (avec les complexes enzymatiques intermédiaires et éventuellement ceux avec d'autres ligands : autres substrats, inhibiteurs, activateurs, etc.) ;
- écrire l'équation de conservation : $(E)_t = (E) + (ES) + \dots$ ;
- écrire l'équation de formation du produit : $v_0 = k_2\,(ES) + \dots$ ;
- diviser $v_0$ par $(E)_t$ et exprimer la concentration de chaque complexe enzymatique intermédiaire en fonction de (E) libre et de la constante de dissociation du complexe, e.g., $(ES) = (E)(S)/K_d$, etc.

On obtient dans notre cas simple :

$$\frac{v_0}{(E)_t} = \frac{k_2(ES)}{(E)+(ES)} = \frac{k_2(E)\dfrac{(S)}{K_d}}{(E)\left[1+\dfrac{(S)}{K_d}\right]} = k_2\frac{(S)}{K_d+(S)}$$

On en déduit :

$$\frac{v_0}{V_{max}} = \frac{(ES)}{(E)_t} = \frac{(S)}{K_d+(S)} = \overline{Y_S} \qquad (6)$$

$\overline{Y_S}$ = fonction de saturation de l'enzyme comprise entre 0 et 1 = rapport des espèces enzymatiques libérant du produit sur la somme des espèces enzymatiques.

## 3. Modèle plus réaliste de l'état stationnaire ⇒ Km (Briggs et Haldane, 1925)

Ce modèle, plus général que le précédent dit de l'« équilibre rapide », ne présuppose pas que $k_2 << k_{-1}$. Si, par exemple, $k_2$ n'est plus négligeable devant $k_{-1}$, le véritable équilibre n'est jamais atteint. Après la réaction (*fig. 1*) et après une phase *préstationnaire* très courte (quelques msec), la concentration de ES atteint une valeur pratiquement constante correspondant à un équilibre dynamique entre vitesses de formation et de disparition. Cet équilibre dynamique dénommé « état stationnaire » se maintiendra pendant un temps d'autant plus long que $(S)_0$ est plus grand.

La démarche pour obtenir l'équation de la vitesse $v_0 = k_2\,(ES)$ est la même que pour l'équilibre rapide. Cependant, ici, la concentration de ES ne peut plus être obtenue à partir de $K_d$ mais à partir de l'égalité des vitesses de formation et de disparition de ES. L'expression de $v_0$ conserve la même forme mais $K_d$ est remplacé par une expression plus complexe des constantes de vitesse : la constante dite « de Michaelis » (ou $K_M$), assimilable à une pseudo constante de dissociation qui regroupe les dissociations de ES en substrat et en produit.

$$v_{formationES} = v_{disparitionES} \Rightarrow k_1(E)(S) = (k_{-1}+k_2)(ES)$$

On en déduit :

$$(ES) = \frac{k_1}{(k_{-1} + k_2)}(E)(S) = \frac{(E)(S)}{K_M} \text{ avec } K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_2}{k_1} = K_d + \frac{k_2}{k_1}$$

et

$$\frac{v_0}{V_{max}} = \frac{(ES)}{(E)_t} = \frac{(S)}{K_M + (S)} \quad (7)$$

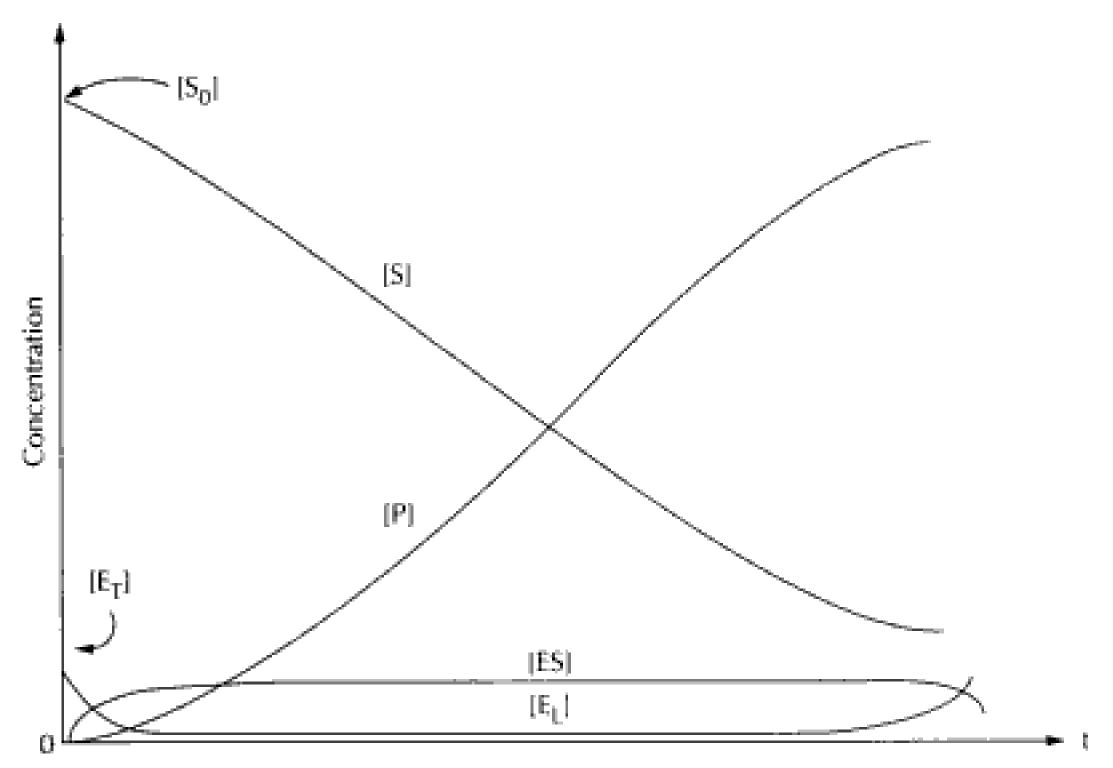



**Figure 1.** Cinétique des différents partenaires de la réaction enzymatique. Au temps t = 0 seuls E et S sont en présence. La durée de l'état stationnaire, $\frac{d(ES)}{dt} = 0$ augmente avec $(S)_0$

### a) Considérations sur le $K_M$

$K_M$ a les dimensions d'une concentration. L'expression de $K_M$ en fonction des constantes de vitesse est en réalité plus complexe que dans le cas très schématisé d'une réaction à un seul substrat avec un seul complexe ES car, le plus souvent, plusieurs complexes intermédiaires et plusieurs substrats participent à la réaction, mais cela ne change pas la signification globale du $K_M$ :

- $K_M$ est ≥ à la constante de dissociation $K_d$. On constate logiquement que $K_M = K_d$ lorsque $k_2 << k_{-1}$, c'est-à-dire lorsque l'étape catalytique est lente devant l'étape de dissociation de ES en E et S (cas de l'équilibre rapide, voir « *Hypothèse 3* ») ;
- $K_M$ est le plus souvent compris entre $10^{-1}$ et $10^{-8}$ M ;
- $K_M$ donne la concentration en substrat permettant une demi-saturation de l'enzyme. Lorsque (S) est exprimée en nombre de $K_M$, i.e., $(S) = a\,K_M$, la fonction de saturation prend la forme simple :

$$\overline{Y_S} = \frac{v_0}{V_{max}} = \frac{(ES)}{(E)_t} = \frac{a}{a+1} ;$$

- Intérêt du $K_M$ pour le biologiste :
  - $K_M$ donne un ordre de grandeur de la concentration en substrat *in vivo*,
  - la connaissance de la valeur du $K_M$ est indispensable pour optimiser *in vitro* un dosage d'enzyme ou de substrat,
  - $K_M$ apporte un ordre de grandeur sur l'affinité de différents isoenzymes pour leur substrat.

**b) Considérations sur $V_{max}$**

Lorsque (S) >> $K_M$, l'enzyme est entièrement complexée au substrat (ES) = $(E)_t$, et la vitesse initiale tend vers l'expression $v_0 = V_{max} = k_{cat}\,(E)_t = k_{cat}\,(E)_t\,(S)^0$.
On constate que la vitesse initiale est d'ordre 0 par rapport à (S) et d'ordre 1 par rapport à $(E)_t$. Cette situation est recherchée en biologie clinique (bien que non obligatoire en pratique), lorsque l'on souhaite doser la concentration d'une enzyme dans un liquide biologique par cinétique enzymatique.

**c) Considérations sur le $k_{cat}$**

- $k_{cat}$ a les dimensions de l'inverse d'un temps.
- $k_{cat}$ correspond lorsque l'enzyme est saturé par le substrat, au nombre de cycles catalytiques effectués par site enzymatique et par unité de temps = *turn-over number* = *activité moléculaire spécifique*.
- $k_{cat}$ est le plus souvent compris entre $10^{+4}$ et $10^{+9}$ $min^{-1}$.

**d) Considérations sur le rapport $k_{cat}/K_M$**

- Si l'étape de catalyse est relativement lente par rapport à l'étape d'équilibre (hypothèse de l'équilibre rapide) :

$$\frac{k_{cat}}{K_M} \# \frac{k_{cat}}{K_D} = k_{cat}.K_A.$$

  Le rapport représente dans ce cas l'efficacité des étapes de fixation et de catalyse.
- Lorsque (S) << $K_M$, la vitesse initiale tend vers l'expression :

$$v_0 = \frac{V_{max}}{K_M}(S) = \frac{k_{cat}}{K_M}(E)_t(S).$$

On constate pour $(E)_t$ fixée, que $v_0$ devient directement proportionnelle au rapport $k_{cat}/K_M$ et à (S). Cette situation est recherchée en biologie clinique lorsque l'on souhaite doser la concentration d'un substrat S par cinétique enzymatique.

## B. Mesure de la vitesse initiale

La vitesse initiale correspond en pratique à des conditions d'irréversibilité, puisque (P) est # 0. Elle peut être mesurée à partir de la cinétique de disparition du substrat ou d'apparition du produit. Elle correspond littéralement à la valeur absolue de la tangente à la courbe (P) ou (S) = f(t) au temps t = 0 :

$$v_0 = \left|\frac{d(P)}{dt}\right|_{t \to 0}.$$

La cinétique [P] = f(t) peut présenter une zone pseudo linéaire plus ou moins prolongée (*fig.* 2) entre t = 0 et t = (0 + Δt). Cette zone correspond aux conditions de vitesse initiale puisque les pentes à l'origine et celle de la droite sont confondues. Par approximation, on considère que l'on reste en condition de vitesse initiale pour une consommation en substrat Δ(S) ≤ 5 %.
Au plan pratique, c'est seulement dans cette zone que l'on pourra mesurer $v_0$ et que les *équations* 6 et 7 s'appliqueront. Considérant ces équations, on constate qu'une vitesse initiale augmente directement avec la concentration en enzyme et de façon hyperbolique avec la concentration en substrat. Il en va différemment pour l'intervalle de temps Δt (correspondant à la zone de linéarité de la *figure* 2) utilisable pour mesurer cette vitesse initiale.

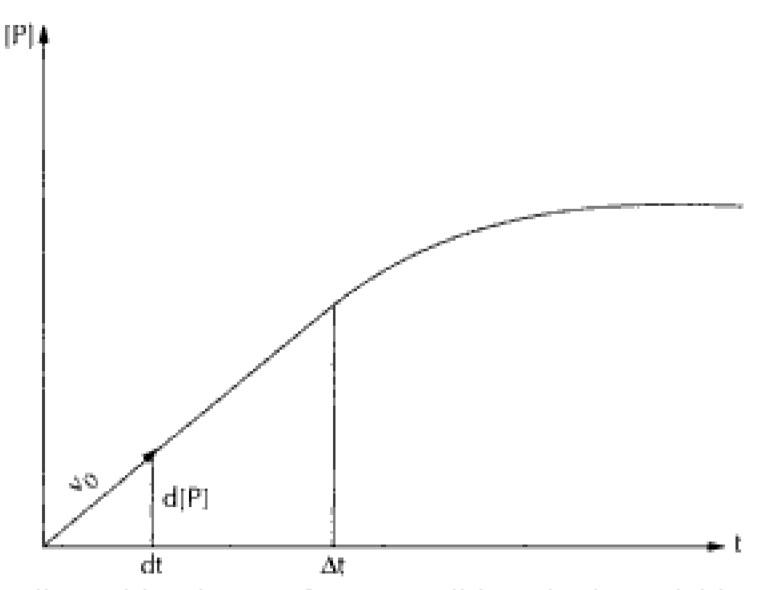



**Figure 2.** Cinétique d'apparition du produit : les conditions de vitesse initiale correspondent à l'intervalle Δt

## Deux cas sont à considérer

■ $v_0 = f(E)_t$

Dans le milieu réactionnel, tous les paramètres physico-chimiques de la réaction enzymatique sont définis (*conditions conventionnelles*), sauf la concentration en enzyme $(E)_t$ que l'on souhaite connaître et qui devient la variable. En prenant l'exemple de l'*équation* 7, nous avons :

$$V_0 = K.(E)t \tag{8}$$

avec
$$K = k_{cat}\frac{(S)_{(0)}}{K_M + (S)_0} = \text{ cte},$$

puisque la concentration en substrat $(S)_0$ introduite au temps t = 0, est fixée.
On constate (*fig.* 3) que la vitesse initiale augmente linéairement avec $(E)_t$. Il en résulte une diminution du temps Δt de linéarité car une même concentration en substrat (S) introduite à t = 0 est consommée plus rapidement par une concentration d'enzymes plus élevée.

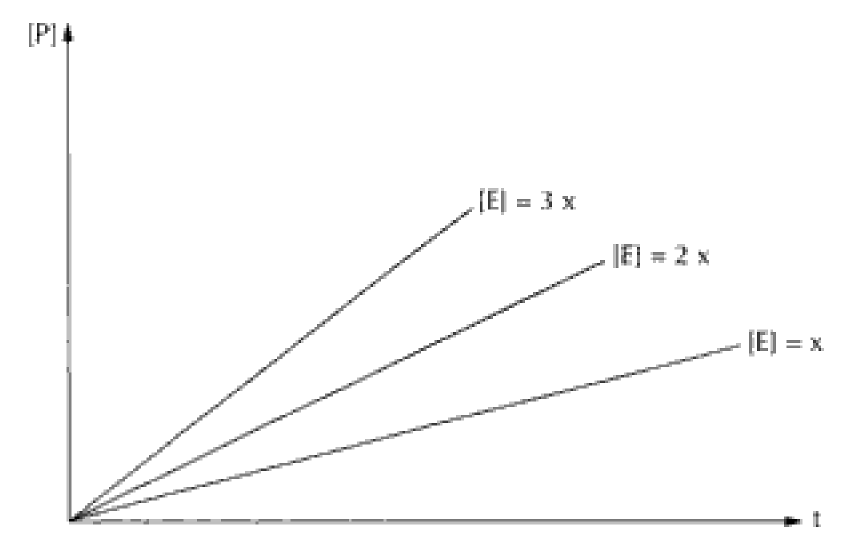



**Figure 3.** Cinétique d'apparition du produit : $(S)_0$ définie, $(E)_t$ variable

**Application de l'*équation 8* en biologie clinique et en recherche : mesure indirecte de la concentration d'une enzyme** [1]

Dans les conditions conventionnelles définies ci-dessus, l'application de l'*équation 8* permet théoriquement de calculer $(E)_t$ connaissant $v_0$. En pratique, l'absence d'étalon pour les enzymes interdit cette démarche et $(E)_t$ est exprimée indirectement par la valeur de $v_0$ après transformation en *unités arbitraires* reflétant le travail effectué par l'enzyme dans le milieu réactionnel. Deux types d'unités sont proposées :

- l'*unité U* correspond à une quantité d'enzymes qui, en conditions conventionnelles bien définies, consomme par minute 1 µmole de substrat ou produit 1 µmole de produit ;
- le *katal Kat* correspond à une quantité d'enzymes qui, en conditions conventionnelles bien définies, consomme par seconde 1 mole de substrat ou produit 1 mole de produit.

Ces unités arbitraires permettent l'expression indirecte de la concentration d'une enzyme dans un milieu biologique ou au cours d'une purification. Bien entendu, deux concentrations enzymatiques exprimées par ces unités ne peuvent être comparées que si elles ont été mesurées dans les mêmes conditions conventionnelles.

*Exemples* :

- premier cas : un *laboratoire X* mesure la concentration en LDH d'un *sérum A* en choisissant pour les conditions conventionnelles une demi-saturation de l'enzyme (S) = 1 Km. La vitesse $v_0$ mesurée est de 300 µmol/L.min. Cette vitesse qui, dans le cas présent, exprime un travail effectué dans un volume de 1 L, est le reflet du nombre de travailleurs, i.e., molécules d'enzyme, présents dans ce litre. Si l'on quantifie ce travail en unités U, on obtient une concentration enzymatique de 300 U/L ;
- deuxième cas : la $v_0$ mesurée par ce même laboratoire sur un *sérum B* dans les mêmes conditions conventionnelles est de 600 µmol/L.min. On en déduit fort

1. On utilise couramment le terme trop général d'« activité enzymatique » qu'il vaudrait mieux remplacer par celui, plus précis, de « concentration catalytique ».

justement, puisque $v_0$ est proportionnelle à $(E)_t$, que la concentration en LDH du sérum B à 600 U/L est deux fois plus élevée que celle du sérum A ;

- troisième cas : un *laboratoire Y* mesure la concentration catalytique en LDH du *sérum A* par une méthode optimisée (pour les nouvelles conditions conventionnelles, la concentration en substrat est saturante, les autres paramètres physico-chimiques demeurant inchangés). Il mesure logiquement une concentration catalytique de 600 U/L. Le médecin confronté à ces deux résultats est dubitatif : une même concentration en LDH est exprimée par deux valeurs différentes ! Quelle valeur choisir ? Les deux résultats sont bons en théorie mais, en pratique, on ne peut les comparer car le travail a été effectué dans des conditions conventionnelles (environnementales, etc.) différentes.

*Conclusion* : les concentrations catalytiques expriment indirectement les concentrations d'une enzyme qui effectue un travail. Pour pouvoir comparer différentes concentrations catalytiques entre elles il faut placer l'enzyme travailleuse dans le même environnement professionnel, i.e., les mêmes conditions conventionnelles.

■ $v_0 = f(S)_0$

Dans le milieu réactionnel, tous les paramètres physico-chimiques sont définis, sauf la concentration en substrats introduite au temps $t = 0$ : $(E)_t$ fixée, $(S)_0$ variable. Reconsidérant les *équations* 6 et 7, on constate que la vitesse initiale augmente de façon hyperbolique avec $(S)_0$ et tend vers une limite correspondant à la vitesse maximale $V_{max}$ (*fig.* 5).

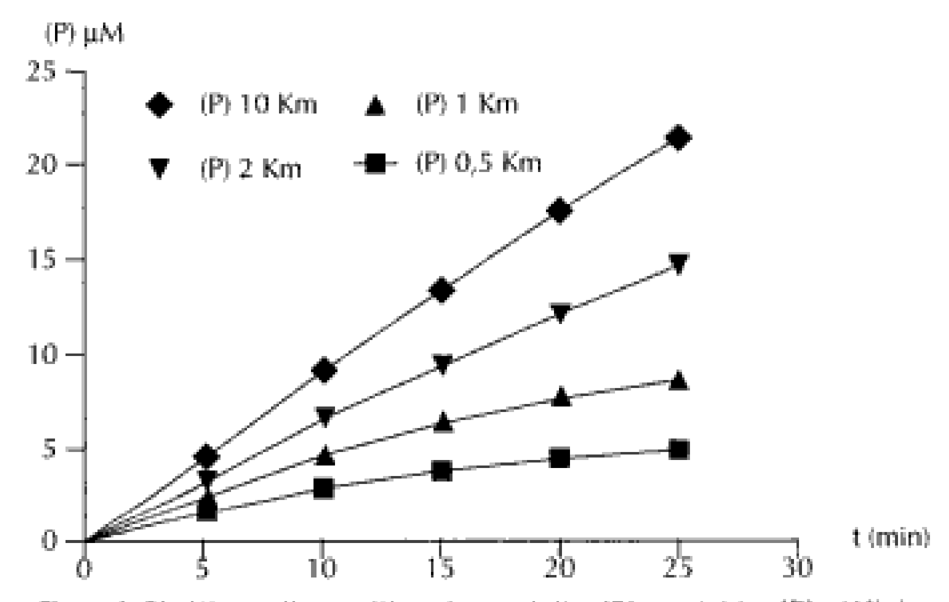



**Figure 4.** Cinétique d'apparition du produit : $(S)_0$ variable, $(E)_t$ définie

Dans la représentation (P) = f(t), et pour des concentrations en $(S)_0$ croissantes, on constate (*fig.* 4), avec l'augmentation de $v_0$, une augmentation du temps $\Delta t$ pendant lequel on peut considérer la cinétique comme linéaire. En effet, lorsque (S) augmente, une même concentration en enzyme mettra plus de temps pour atteindre la limite de 5 % de substrat consommé (limite approximative fixée ci-dessus pour le respect des conditions de vitesse initiale).

*NB* : considérant les points « $v_0 = f(E)_t$ » et « $v_0 = f(S)_0$ » ci-dessus, pour optimiser la mesure d'une concentration catalytique il faut travailler en conditions conventionnelles telles que $v_0 = K.(E)_t$ et avec le facteur K le plus élevé possible. Il en résulte un signal mesuré plus élevé, un Δt pour le respect des conditions de $v_0$ plus important et donc une meilleure précision pour l'ensemble de la mesure.

Le facteur $K = k_{cat} \frac{(S)_0}{K_M + (S)_0}$ tend vers un maximum $k_{cat}$ lorsque $\frac{(S)_0}{K_M + (S)_0} \to 1$.

Dans ce cas, l'enzyme est saturée par le substrat : $(S)_0 \gg K_M$ (en pratique > 10 $K_M$).

## C. Expressions graphiques de l'équation d'Henri-Michaelis-Menten

De nombreuses représentations graphiques ont été proposées, qui ont toutes pour finalité de mesurer $K_M$, $V_{max}$ et $k_{cat}$. $K_M$ est directement mesuré sur le graphe tandis que $k_{cat}$ est calculé à partir de la mesure graphique de $V_{max}$ connaissant $(E)_t$. Ne sont décrites ici que les quatre représentations les plus citées : la représentation hyperbolique et trois représentations linéaires.

### 1. Représentation directe de l'équation de HMM : $v_0 = f[(S)]$

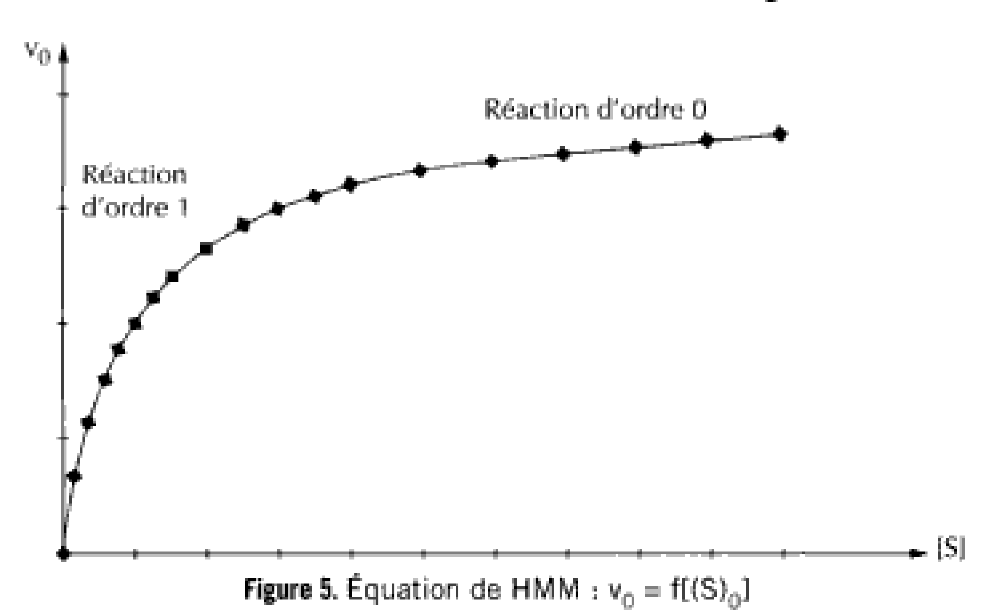



**Figure 5.** Équation de HMM : $v_0 = f[(S)_0]$

Pour $(E)_t$ fixée, on mesure la vitesse initiale en fonction de concentrations croissantes en substrat $(S)_0$. La courbe hyperbolique $v_0 = f(S)$ peut être décomposée en trois zones :

- Zone 1 : $(S)_0 \ll K_M$ en pratique, $(S) \leq 0{,}1\ K_M$. L'équation de Michaelis devient :

$$v_0 = \frac{k_{cat}(E)_t}{K_M}(S) = \frac{V_{max}}{K_M}(S) = K(S). \qquad (9)$$

  La vitesse initiale est d'ordre 1 par rapport à (S). Dans ces conditions, il est possible de doser un substrat par la mesure de $v_0$ (mesure de la concentration en substrat par cinétique enzymatique). Le coefficient *K* est en pratique déterminé par un étalonnage préalable.

- Zone 3 : $(S)_0 \gg K_M$ en pratique, $(S) \leq 10\ K_M$. L'équation de Michaelis devient :

$$v_0 = k_{cat}(E)_t(S)^0 = k_{cat}(E)_t = V_{max}. \quad (10)$$

La vitesse initiale ne dépend plus de (S) – ordre 0 par rapport à (S) – car l'enzyme est saturée par le substrat : $(ES) = (E)_t$. En revanche, $v_0$ est directement proportionnelle à $(E)_t$. Ce sont les conditions optimales pour doser la concentration catalytique d'une enzyme (voir « $v_0 = f(S)_0$ » ci-dessus).

*NB* : la $V_{max}$ est aussi une vitesse initiale. Si, ayant déterminé Vmax, on connaît en outre $(E)_t$, il est alors possible de calculer $k_{cat}$.

- Zone 2 : $0{,}1\ K_M \leq (S)_0 \leq 10K_M$.
  L'ordre de la vitesse initiale par rapport à (S) est compris entre 0 et 1.

Considérant la relation $v_0 = K.(E)_t$, avec $K = cte = k_{cat}\dfrac{(S)_{(0)}}{K_M + (S)_0}$,

il est toujours théoriquement possible de doser la concentration catalytique d'une enzyme, mais les conditions sont d'autant moins optimales que (S) est plus petit (diminution du $\Delta t$ respectant les conditions de $v_0$, signal plus faible).

Cette représentation simple permet :
- de mesurer $V_{max}$ si les concentrations en substrat sont suffisamment élevées pour que $v_0$ tende vers son asymptote. Dans le cas contraire, il faudra adopter une représentation linéaire de l'*équation 7* ;
- de mesurer $K_M$ connaissant $V_{max}/2$. En effet, reprenant l'*équation 7*, on constate que $K_M$ définit la concentration en substrat permettant une demi-saturation de l'enzyme :

pour $(S) = K_M (ES) = 0{,}5\ (E)_t$ et $v_0 = 0{,}5\ V_{max}$.

## 2. Représentation aux inverses de Lineweaver et Burk : $1/v_0 = f[1/(S)]$

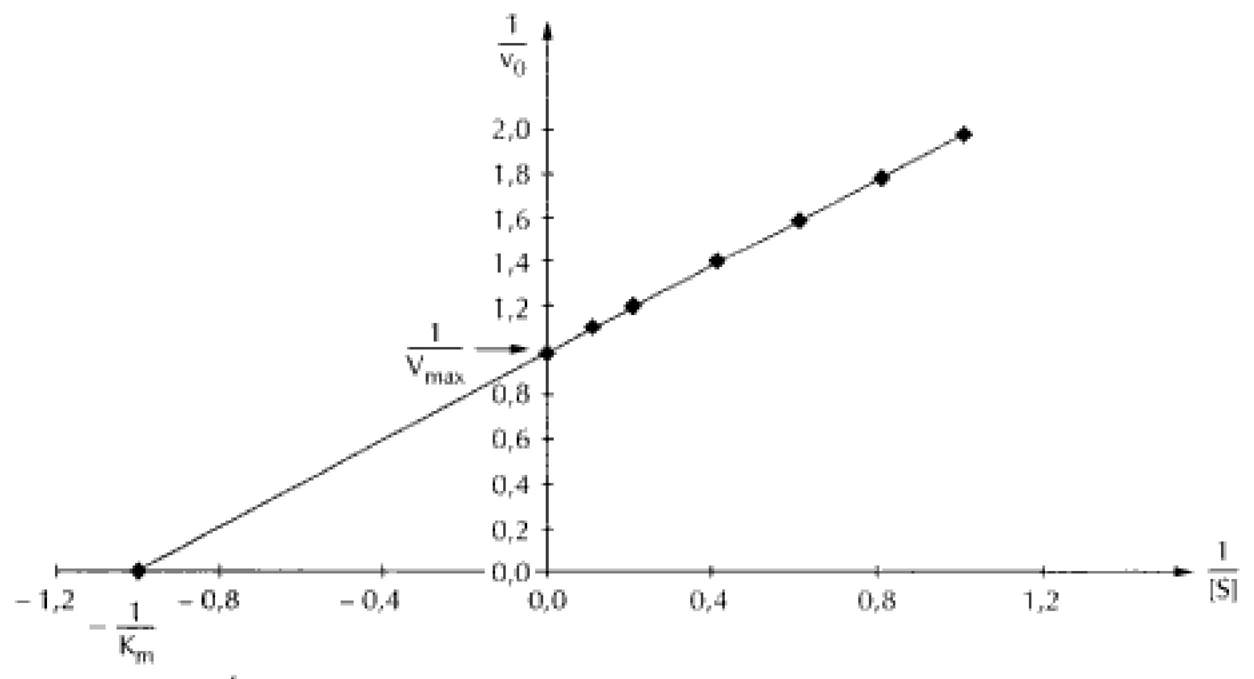



**Figure 6.** Équation de HMM : représentation aux inverses de Lineweaver et Burk

Inversant l'*équation 7* :

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M + (S)}{V_{max}(S)} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{(S)}. \quad (11)$$

Cette représentation, la plus décrite, présente l'avantage apparent de pouvoir mesurer $K_M$ et $V_{max}$ à partir d'un nombre limité de points expérimentaux et sans atteindre l'asymptote de la courbe hyperbolique. Cependant, du fait de l'inversion des variables, les erreurs sur les faibles valeurs de (S) et de $v_0$ sont amplifiées.

## 3. Représentation d'Eadie $v_0 = f[v_0/(S)]$

Multipliant les deux membres de *l'équation 7* :

$$v_0[K_M + (S)] = (S)V_{max}.$$

Puis divisant chaque membre par (S), vient :

$$v_0 = V_{max} - K_M \frac{v_0}{(S)}. \quad (12)$$

*NB* : en inversant les variables y et x, on obtient la représentation d'Eadie-Scatchard : $[v_0/(S)] = f(v_0)$.

$$\frac{v_0}{(S)} = \frac{V_{max}}{K_M} - \frac{v_0}{K_M}. \quad (13)$$

L'*équation 13* correspond au cas particulier de la relation de Scatchard appliquée aux enzymes. En effet, puisque $v_0 = k_{cat}(ES)$ et $V_{max} = k_{cat}(E)_t$, en divisant les deux membres de l'*équation 13* par $k_{cat}$, il vient :

$\frac{(ES)}{(S)} = \frac{(E)_t}{K_M} - \frac{(ES)}{K_M}$, relation identique à la relation de *Scatchard* appliquée à une protéine récepteur R

de constante de dissociation $K_D$ : $$\frac{(RS)}{(S)} = \frac{(R)_t}{K_D} - \frac{(RS)}{K_D}. \quad (14)$$

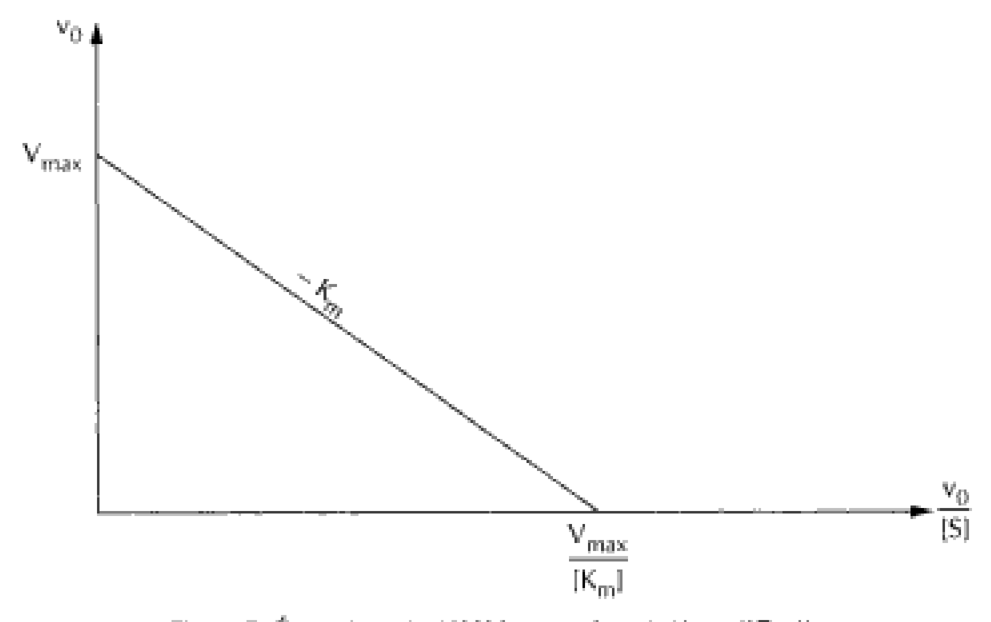



**Figure 7.** Équation de HMM : représentation d'Eadie

### 4. Représentation d'Eisenthal et Cornish-Bowden (1974)

Cette représentation est plus connue sous le nom de « représentation graphique linéaire directe ». Elle consiste à réarranger l'équation classique de HMM en l'exprimant selon le mode $V_{max} = f(K_M)$, soit

$$V_{max} = v_0 + \frac{v_0}{(S)} K_M. \tag{15}$$

*Par exemple* :

- pour l'expérience 1, nous avons un couple de valeurs $v_{01}$ et $(S)_1$ qui permet de tracer une première droite $V_{max} = f(K_M)$ qui a pour intersections avec l'axe des ordonnées la valeur $v_{01}$ et avec l'axe des abscisses la valeur $-(S)_1$. Cette droite est le lieu géométrique de toutes les paires de valeurs ($V_{max}$, $K_M$) possibles pour les valeurs expérimentales $v_{01}$ et $(S)_1$ mesurées ;
- pour l'expérience 2, nous avons un couple de valeurs $v_{02}$ et $(S)_2$ qui permet de tracer une deuxième droite d'intersections avec les axes : $v_{02}$ et $-(S)_2$, etc.

Dans nos conditions opératoires, il n'y a pour chaque droite qu'une seule et même paire de valeurs ($V_{max}$, $K_M$) possible (puisque tous les paramètres sont définis sauf la concentration en substrats). On en déduit que les différentes droites ont une intersection commune de coordonnées $V_{max}$ et $K_M$.

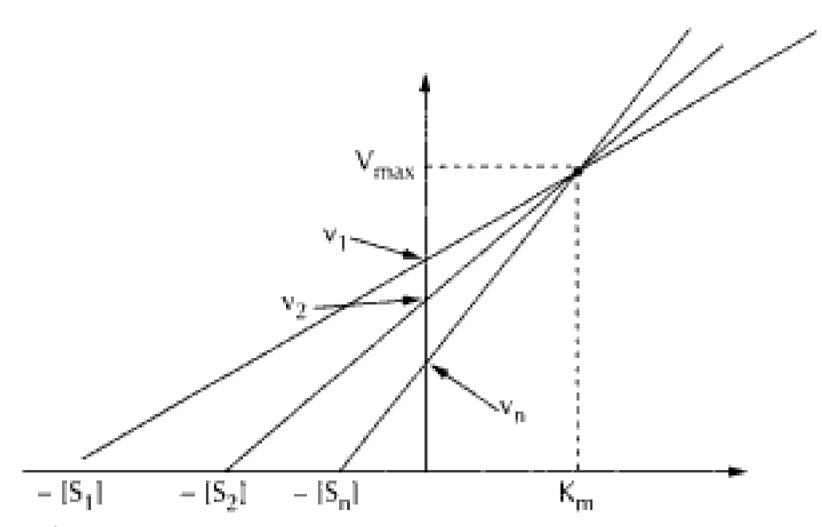



**Figure 8.** Équation de HMM : représentation d'Eisenthal et Cornish-Bowden

## II. Étude de cinétiques réversibles : effet du produit sur la vitesse

### A. Modèle plus réaliste à *deux complexes centraux*

Le schéma réactionnel (toujours pour un seul substrat) est le suivant :

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} EP \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} E + P$$

Avec $$(E)_t = [(E) + (ES) + (EP)]$$

## 1. Hypothèse de l'équilibre rapide : cas fréquent mais pas toujours vérifié

On postule d'une part que les complexes ES et EP sont en *équilibre rapide* avec leurs ligands S et P et, d'autre part, que les étapes de catalyse de ES en EP et vice-versa ($k_{+2}$ et $k_{-2}$ dans le schéma ci-dessus) sont les étapes limitantes :

- *in vitro*, l'AE est habituellement mesurée en conditions de $v_0$ et on peut écrire pour les vitesses initiales aller et retour :

$$v_{0A} = \frac{V_{maxA}(S)}{K_S + (S)} \quad \text{et} \quad v_{0R} = \frac{V_{maxR}(P)}{K_P + (P)}$$

dans le sens aller $\quad V_{maxA} = k_2(E)_t \quad K_S = \frac{(E)(S)}{(ES)} = \frac{k_{-1}}{k_1}$

et dans le sens retour $V_{maxR} = k_{-2}(E)_t \quad K_P = \frac{(E)(P)}{(EP)} = \frac{k_3}{k_{-3}}$ ;

- *in vivo*, les conditions sont différentes. Nous sommes en présence d'une proportion variable de S et P. La *vitesse nette v* dans un sens (ou l'autre) ne peut être calculée par la différence ($v_{0A} - v_{0R}$) des équations ci-dessus qui supposent l'absence du « produit » ou du « substrat ». Ainsi, par exemple, pour le sens aller, la vitesse nette vers la formation du produit a pour expression :

$$v_{nette} = \frac{d(P)}{dt} = v_A - v_R \quad \text{avec} \quad v_A = k_2(ES) \quad \text{et} \quad v_R = k_{-2}(EP)$$

$$v_{nette} = k_{+2}(ES) - k_{-2}(EP). \tag{16}$$

Divisant les deux membres de l'*équation 16* respectivement par $(E)_t$ et son équivalent [(E) + (ES) + (EP)] et remplaçant (ES) et (EP) par leur expression en fonction de $K_s$ et $K_p$, on obtient finalement pour la vitesse nette dans le sens aller :

$$v_{nette} = \frac{V_{maxA}\frac{(S)}{K_S} - V_{maxR}\frac{(P)}{K_P}}{1 + \frac{(S)}{K_S} + \frac{(P)}{K_P}}$$

qui s'écrit

$$= \frac{V_{maxA}(S)}{K_S\left[1 + \frac{(P)}{K_P}\right] + (S)} - \frac{V_{maxR}(P)}{K_P\left[1 + \frac{(S)}{K_S}\right] + (P)}. \tag{17}$$

*Commentaires sur* l'équation 17 : P et S, qui sont en compétition pour le même centre actif, se comportent comme des I compétitifs mutuels (voir « *Inhibition compétitive* »). Ainsi, pour la constante de dissociation apparente pour S nous avons l'expression :

$$K_{S\,app} = K_S\left[1 + \frac{(P)}{K_P}\right],$$

qui est de la même forme que $K_{S\,app} = K_S\left[1+\frac{(I)}{K_i}\right]$

si P se comporte comme un inhibiteur compétitif. On constate le même comportement pour la constante de dissociation apparente pour P :

$$K_{P\,app} = K_P\left[1+\frac{(S)}{K_S}\right].$$

## 2. Hypothèse de l'état stationnaire

Cette hypothèse est plus générale car elle ne présuppose pas que les étapes de catalyse sont systématiquement lentes par rapport aux étapes de dissociation des complexes ES ou EP. Mais le traitement mathématique, plus laborieux, ne sera pas ici abordé. Retenons simplement que la vitesse nette dans l'état stationnaire a la même expression que dans l'*équation 17*. Cependant, les constantes de dissociation $K_s$ et $K_p$ sont remplacées par les $K_m$ correspondants. Les expressions des $K_m$ et $k_{cat}$ en fonction des constantes de vitesse sont aussi plus complexes. Par exemple, dans le sens aller :

$$k_{catA} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_{-2} + k_3} \quad \text{et} \quad K_{mS} = \frac{k_{-1}k_3 + k_{-1}k_{-2} + k_2 k_3}{k_1(k_2 + k_{-2} + k_3)}.$$

*NB* : on constate que lorsque $k_2$ et $k_{-2}$ << par rapport aux autres constantes de vitesse, les $K_m$ et $k_{cat}$ tendent vers les expressions démontrées pour l'hypothèse de l'équilibre rapide.

## 3. Relation de Haldane

À l'équilibre de la réaction, la vitesse nette est égale à zéro

et $$K_{eq} = \frac{(P)_{eq}}{(S)_{eq}} = \frac{k_1 k_2 k_3}{k_{-1}k_{-2}k_{-3}}.$$

Reprenant le numérateur du premier membre de l'*équation 17*, nous avons l'égalité :

$$v_{nette} = V_{maxA}\frac{(S)_{eq}}{K_S} - V_{maxR}\frac{(P)_{eq}}{K_P} = 0\,.$$

On en déduit $$K_{eq} = \frac{(P)_{eq}}{(S)_{eq}} = \frac{V_{maxA}/K_S}{V_{maxR}/K_P} \quad \text{relation de Haldane.} \qquad (18)$$

*NB* : dans le cadre de l'hypothèse de l'état stationnaire, on remplacera dans l'*équation 18* les constantes de dissociation par les $K_M$ correspondants.

# B. Interactions protéine ligand : relation de Scatchard

## 1. Définitions

Beaucoup de protéines (e.g., enzyme, Ac, récepteur, transporteur, etc.) présentent la propriété de reconnaître spécifiquement un ligand selon le modèle de l'équilibre rapide. La capacité de liaison du ligand par la protéine dépendra de la constante

d'affinité $K_A$ (= $1/K_D$) et du nombre *n* de sites de reconnaissance pour chaque molécule de protéine.

## 2. Approche quantitative

### a) Hypothèse

Un ligand S est en équilibre avec une protéine réceptrice de concentration totale $(R)_0$ et possédant, par molécule, n récepteurs R indépendants et de même affinité pour le ligand S.

$$R + S \rightleftharpoons RS.$$

La constante de dissociation intrinsèque d'un site $K_D$ est égale à :

$$K_D = \frac{1}{K_A} = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{(R)(S)}{(RS)}.$$

La concentration totale en récepteurs $(R)_t$ est égale à n fois la concentration totale en protéine réceptrice $n(R)_0$ : $(R)_t = n(R)_0$.

La concentration en récepteur lié RS) est égale à : $(RS) = (R)_t - (R) = (S)_{lié}$.

En remplaçant dans l'expression de $K_D$ la concentration de $(R)$ par $(R)_t - (RS)$,

on obtient : $$\frac{(RS)}{(S)} = \frac{(R)}{K_D} = \frac{(R)_t}{K_D} - \frac{(RS)}{K_D} = \frac{n(R)_0}{K_D} - \frac{(RS)}{K_D}. \qquad (19)$$

L'*équation 19* est plus connue sous le terme de « relation de *Scatchard* ». Elle permet (par des expériences de dialyse à l'équilibre), en faisant varier (S) et en déterminant (RS) pour chaque valeur de (S), de tracer la droite (RS)/(S) = f (RS), de pente $- 1/K_D$ ou $- K_A$ et d'abscisse à l'origine $n(R)_0$. Cette représentation (*fig. 9*) permet donc de déterminer $K_D$ (ou $K_A$) et n connaissant $(R)_0$.

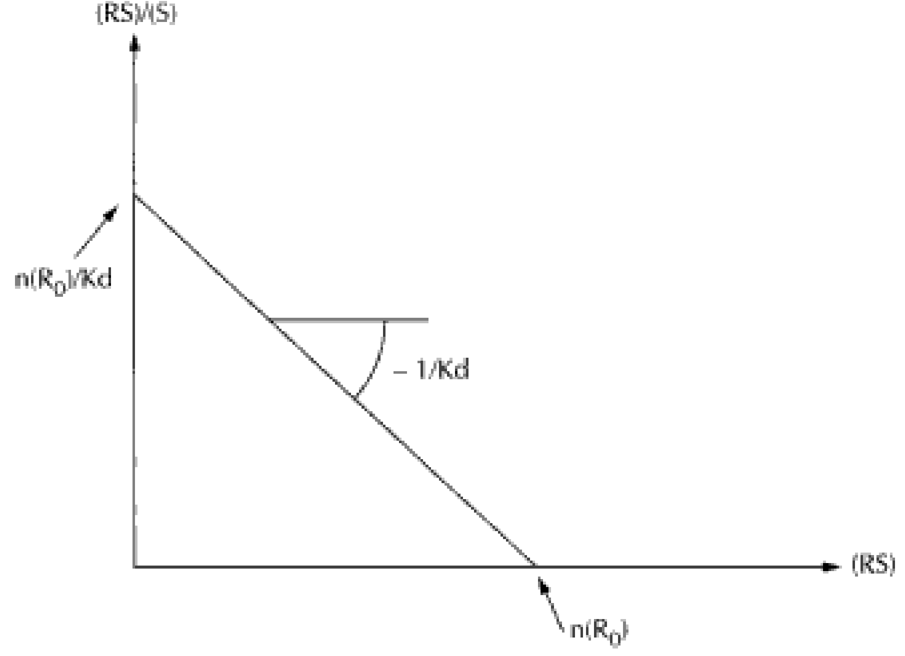



**Figure 9.** Représentation de Scatchard

*NB 1* : *in vivo*, $(R)_t$ est souvent << $(S)_0 \Rightarrow (S) = (S)_0 - (RS) \# (S)_0$. Mais dans les expériences de dialyse à l'équilibre, il est impératif que $(R)_t$ soit de l'ordre de grandeur de $(S)_0$. En effet, on mesure (RS) par la différence entre la somme [(RS) + (S)] mesurée dans le compartiment contenant le récepteur et (S) mesurée dans le compartiment sans récepteur. Pour que la mesure de (RS) soit significative, il faut que la valeur de (RS) soit > à la précision sur la mesure de (S).
*NB 2* : en divisant les deux membres de l'*équation 19* par $(R)_0$, on obtient :

$$\frac{\bar{v}}{(S)} = \frac{n}{K_D} - \frac{\bar{v}}{K_D} \quad \text{avec } \bar{v} = \frac{(RS)}{(R)_0},$$

la fonction $\bar{v}$ exprimant le nombre de molécules de RS (ou S liées) par molécule de protéine réceptrice.
*NB 3* : si dans l'*équation 19* on intervertit les axes des y et x et si la protéine R est une enzyme E, on obtient l'expression de $v_0$ dans la représentation d'*Eadie-Hofstee* (*fig. 7*).

$$(ES) = n(E)_0 - K_m \frac{(ES)}{(S)} = (E)_t - K_m \frac{(ES)}{(S)} \Rightarrow \text{(en multipliant par } k_2\text{)} \; v_0 = V_{max} - K_m \frac{v_0}{(S)}.$$

### b) Principe de la dialyse à l'équilibre

Le système de dialyse est constitué de deux compartiments (A et B) séparés par une *membrane semi-perméable*. Le diamètre moyen des pores de la membrane est choisi pour être inférieur à celui de la protéine réceptrice R.

- à t = 0 :
  - le compartiment A ne contient que la protéine R introduite à une concentration $(R)_0$ et qui ne peut pas passer dans le compartiment B,
  - le compartiment B ne contient que le ligand ou substrat S introduit à des concentrations variables $(S)_0$ et qui peut diffuser librement vers le compartiment A à travers la membrane pour s'équilibrer avec la protéine R ;
- *au temps t* correspondant à l'*équilibre de dialyse*, les concentrations en substrat libre (S) sont les mêmes dans les deux compartiments. On a donc :
  - dans le compartiment A : (S) libre et (S) lié = (RS),
  - dans le compartiment B : (S) libre.

La différence : valeur de [(S) libre + (S) lié] du compartiment A - valeurs de (S) libre du compartiment B permet de calculer la concentration (S) lié = (RS), donc le rapport (RS)/(S), et de tracer la représentation de Scatchard.

## III. Effecteurs de l'activité enzymatique

Parmi les nombreux effecteurs physico-chimiques répertoriés (pH, température, activateurs, *inhibiteurs*, etc.), seuls les inhibiteurs sont ici développés. Par leur spécificité et leur mode d'action, les inhibiteurs d'enzymes sont des molécules très intéressantes pour le développement de médicaments. D'ailleurs, la plupart des principes actifs des spécialités actuellement sur le marché ou en développement sont des inhibiteurs d'enzymes stratégiques du métabolisme aussi bien des eucaryotes que des procaryotes. Le chapitre des inhibiteurs étant très vaste, nous avons du nous limiter dans les choix des modèles. Nous présentons bien sûr les trois modèles classiques bien décrits dans tous les ouvrages : les inhibitions rapidement réversibles de type *compétitif*, *non compétitif* et *incompétitif*. Il existe cependant d'autres modèles d'inhibition dont l'intérêt est peut-être de mieux représenter la réalité ou de permettre le développement de médi-

caments plus efficaces : inhibiteurs réversibles à forte affinité et/ou à interaction lente, inhibiteurs irréversibles, etc. Sans trop entrer dans le détail de leur cinétique, nous décrivons aussi ces différents modèles dont le concept est relativement récent.

## A. Inhibitions rapidement réversibles simples

### 1. Inhibition compétitive pure[2] : ↗ $K_m$

#### a) Définition

Un inhibiteur compétitif (*IC*) se combine à E, le plus souvent sur le site de fixation du substrat S, de telle sorte que S ne puisse plus se fixer : les fixations d'I et S sont donc mutuellement exclusives (pas de complexe EIS). I est logiquement un analogue du substrat ou du produit non métabolisable ou un substrat alternatif (Man ou Fru pour l'hexokinase) ou encore le produit de la réaction. Dans certains cas, l'IC n'a aucune analogie structurale avec S : c'est le cas de certaines rétroinhibitions, où une enzyme d'une étape d'engagement d'une voie métabolique est inhibée par le produit terminal de la voie métabolique qui, en se fixant sur son site allostérique, rend inaccessible le site de fixation du substrat.

*Exemple d'IC* : le sulfanilamide analogue de l'acide paraminobenzoïque (PABA) est IC de la dihydroptéroate synthétase bactérienne.

*Conséquences* : pour une concentration fixée en enzyme, $V_{max}$ est inchangée, mais l'affinité de E pour S est diminuée ⇒ $K_d$ et $K_m$ sont augmentées.

#### b) Cinétique du modèle pur : selon l'hypothèse de l'équilibre rapide

$$E + S \underset{}{\overset{k_D}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P \qquad K_D = k_{-1}/k_1 = (E)(S)/(ES)$$

$$+ \qquad (ES) = (E)[(S)/KD]$$

$$I$$

$$\updownarrow K_i \qquad K_i = k_{-3}/k_3 = (E)(I)/(EI)$$

$$EI \qquad (EI = (E)[(I)/ Ki]$$

$$\frac{v_0}{(E)_t} = \frac{k_2(ES)}{(E)+(ES)+(EI)} \rightarrow \frac{v_0}{k_2(E)_t} = \frac{v_0}{V_{max}} = \frac{\frac{(S)}{KD}}{1+\frac{(S)}{KD}+\frac{(I)}{Ki}} = \frac{(S)}{KD\left[1+\frac{(I)}{Ki}\right]+(S)}.$$

*NB* : dans le cadre de l'hypothèse de l'état stationnaire, Km remplace Kd.

$$\frac{v_0}{V_{max}} = \frac{(S)}{K_m\left[1+\frac{(I)}{Ki}\right]+(S)} = \frac{(S)}{K_{mapp}+(S)}. \qquad (20)$$

2. Le terme « pur » décrit un modèle dans lequel les fixations d'I et S sont totalement exclusives. Mais on peut très bien concevoir des modèles à exclusion partielle. Par exemple, S pourrait se fixer sur EI mais avec une moindre affinité αKi (α > 1). Une fois formé, le complexe ESI serait catalysé en produit avec la même efficacité que le complexe ES ($k_{cat}$ inchangé). Dans ce cas, nous serions en présence d'une inhibition compétitive *partielle*.

Pour atteindre une fraction donnée de $V_{max}$, il faut toujours la même valeur de (S) quand elle est exprimée en unités $K_m$, i.e., (S) = a.$K_{mapp}$. Mais comme $K_{mapp}$ est augmentée, (S) l'est aussi. Par exemple, calculez (S) en unités $K_m$ pour obtenir 80 % de $V_{max}$ en absence et en présence d'un IC [3].

Le *degré d'inhibition* $= \frac{v_0 - v_i}{v_0} = \frac{(I)}{(I) + K_i(1 + \frac{(S)}{K_m})}$

est d'autant plus élevé que (I) est grand et que $K_i$ et $(S)/K_m$ sont petits.

La concentration en I pour obtenir 50 % d'inhibition est égale à : $IC_{50} = K_i\left[1 + \frac{(S)}{K_m}\right]$.

### c) Autres modèles d'IC

#### *Enzymes ayant plusieurs analogues de S*

Par exemple, une phosphatase pouvant hydrolyser deux esters phosphates A et B. On démontre facilement que :

$$v_0 = \frac{V_{maxA}(A)}{K_{mA}\left[1 + \frac{(B)}{K_{mB}}\right] + (A)} + \frac{V_{maxB}(B)}{K_{mB}\left[1 + \frac{(A)}{K_{mA}}\right] + (B)}.$$

#### *Régulation par le produit*

S et P sont interconvertibles et on suppose que le pool (S) + (P) est constant dans un compartiment cellulaire. Toute variation de (S) entraînera une variation opposée de (P) qui se comportera comme un IC (voir « *Effet du produit sur la vitesse nette* »). Comme dans le cas de la PK, l'ATP est un IC de la fixation de l'ADP.

### d) Représentations graphiques

*A* : $v_0 = f[(S)]$ *B* : $1/v_0 = f[1/(S)]$

**Figure 10.** Inhibition compétitive

3. *Réponse* : en absence de I, (S) = 4 $K_m$ et en présence de I, (S) = 4 $K_{mapp}$.

## 2. Inhibition non compétitive (INC) : ↘ $k_2$ (ou $k_{cat}$)

L'inhibiteur en se fixant sur son site (≠ site substrat) modifie le site catalytique de telle sorte que $0 \leq k_{2i} < k_2$ :

- si $k_{2i} = 0 \Rightarrow$ INC pure ;
- si $0 < k_{2i} < k_2 \Rightarrow$ INC partielle.

*Cas idéal de l'INC pure* : la constante catalytique du complexe ESI est nulle : $k_{2i} = 0$. Il en résulte pour l'ensemble des complexes ES et ESI une constante catalytique $k_2$ apparente diminuée au prorata du rapport (ESI)/(ES).

### a) Hypothèses : $K_i = \alpha K_i$ et $K_d = \alpha K_d \Rightarrow \alpha = 1$

S et I se lient réversiblement et *indépendamment* sur E sans modification mutuelle de leur constante de dissociation $K_D$ et $K_I$, le complexe ESI est ici improductif (contrairement à l'INC partielle).

$$\begin{array}{ccccc}
E + S & \underset{k_D}{\rightleftharpoons} & ES & \longrightarrow EP \overset{k_{+2}}{\longrightarrow} & E + P \\
+ & & + I & & \\
I & & & & \\
\downarrow\uparrow K_i & & \downarrow\uparrow \alpha K_i & & \\
EI + S & \underset{\alpha k_D}{\rightleftharpoons} & ESI & \not\longrightarrow & E + P
\end{array}$$

L'inhibition n'est pas déplacée par S puisque la fixation de I est indépendante de S.

### b) Cinétique : hypothèse de l'équilibre rapide

$$\frac{v_0}{(E)_t} = \frac{k_2(ES)}{(E) + (ES) + (EI) + (ESI)}$$

avec $(ESI) = (EI)(S)/K_d = (ES)(I)/K_i = (E)(S)(I)/K_dK_i$.

$$\frac{v_0}{V_{max}} = \frac{\frac{(S)}{K_d}}{1 + \frac{(S)}{K_d} + \frac{(I)}{K_i} + \frac{(S)(I)}{K_dK_i}} = \frac{(S)}{K_d\left[1 + \frac{(I)}{Ki}\right] + (S)\left[1 + \frac{(I)}{Ki}\right]} = \frac{(S)}{\left[1 + \frac{(I)}{Ki}\right]\left[K_d + (S)\right]}.$$

Par rapport à l'équation normale, les termes $(I)/K_i$ et $(S)(I)/K_dK_i$ correspondent aux contributions respectives des complexes EI et ESI. Le terme $(S)/K_d$ au numérateur indique la présence d'une seule espèce (ES), productive de P. L'équation ci-dessus peut aussi s'écrire :

$$v_0 = \frac{V_{max}(S)}{\left[1 + \frac{(I)}{Ki}\right]\left[K_d + (S)\right]} = \frac{V_{maxi}(S)}{\left[K_d + (S)\right]} \text{ avec } V_{maxi} = \frac{V_{max}}{\left[1 + \frac{(I)}{Ki}\right]}. \qquad (21)$$

$V_{max}$ est diminuée d'un facteur $[1 + (I)/K_i]$ qui représente la distribution de l'inhibiteur dans la forme libre d'E et dans le complexe ES puisque $[(I)/K_i = (EI)/(E) = (ESI)/(ES)]$.

Le *degré d'inhibition* = $\dfrac{v_0 - v_i}{v_0} = 1 - \dfrac{K_i}{K_i + (I)} = \dfrac{(I)}{K_i + (I)}$ est indépendant de (S).
Une variation de (S) entraîne une variation de $v_0$ et $v_i$ dans une même proportion.

### c) Représentations graphiques : $v_0$ = f [(S)] et $1/v_0$ = f [1/(S)]

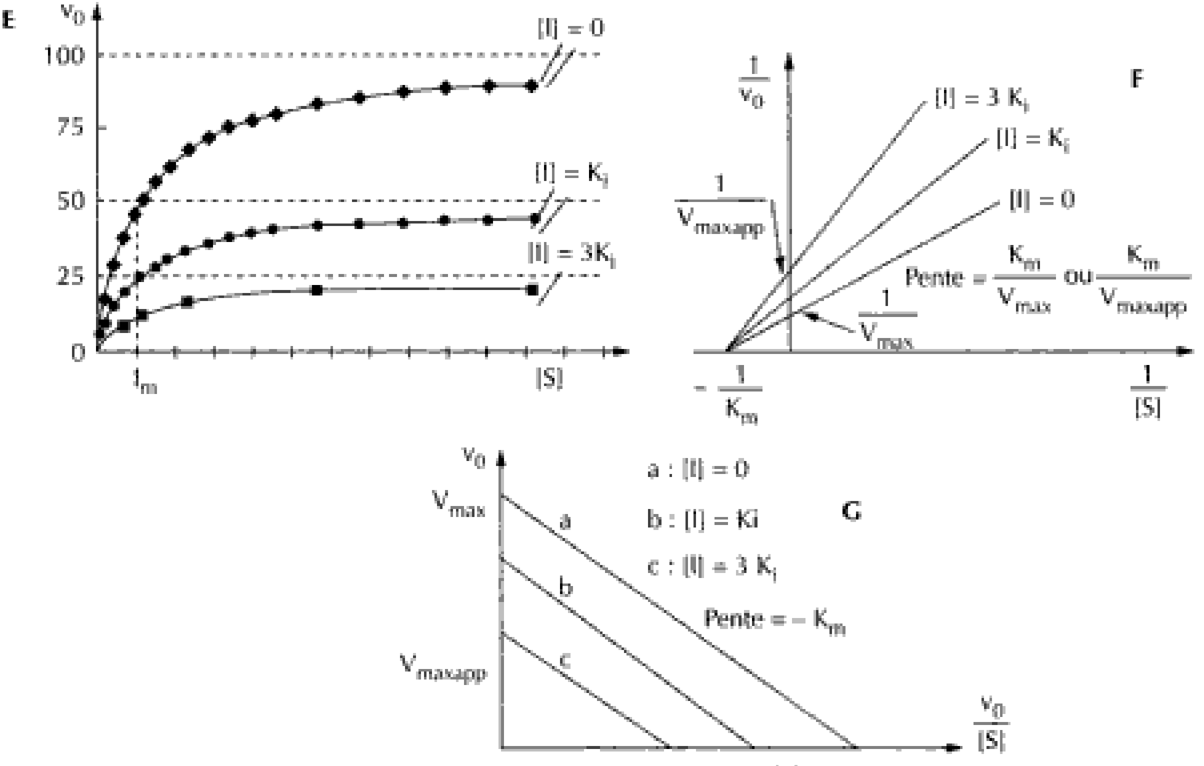



**Figure 11.** Inhibition non compétitive

## 3. Inhibition incompétitive ou anticompétitive (IAC)

### a) Hypothèses

Un I incompétitif se lie réversiblement uniquement au complexe ES avec formation d'un complexe ESI non productif. Il en résulte une diminution de $V_{max}$ et du $K_d$ (ou $K_m$) d'un même facteur [1 + (I)/$K_i$]. Ce schéma (qui correspond à une addition *ordonnée* sur E de deux ligands) est rarement rencontré pour les E à un seul S, mais relativement fréquent pour les E multisubstrats. Contrairement à l'IC, le degré d'inhibition est augmenté par une augmentation de (S).

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_{+2}} E + P$$
$$ES + I \overset{K_i}{\rightleftharpoons} ESI$$

### b) Cinétique : hypthèse de l'équilibre rapide

$$\frac{v_0}{V_{max}} = \frac{(ES)}{(E)_t} = \frac{\dfrac{(S)}{K_d}}{1 + \dfrac{(S)}{K_d} + \dfrac{(S)(I)}{K_d K_i}} = \frac{(S)}{K_d + (S)\left[1 + \dfrac{(I)}{Ki}\right]}.$$

L'équation ci-dessus peut aussi s'écrire :

$$v_0 = \frac{V_{maxi}(S)}{\left[K_{di} + (S)\right]} \text{ avec } V_{maxi} = \frac{V_{max}}{\left[1 + \frac{(I)}{Ki}\right]} \text{ et } K_{di} = \frac{K_d}{\left[1 + \frac{(I)}{Ki}\right]}. \qquad (22)$$

$V_{max}$ et $-K_D$ sont divisés par le même facteur : $[1 + (I)/K_i]$.

Le *degré d'inhibition* $= \frac{v_0 - v_i}{v_0} = \frac{(I)}{(I) + K_i(1 + \frac{(K_d)}{(S)})}$

est d'autant plus élevé que (I) et (S) sont plus grands.

### c) Représentations graphiques

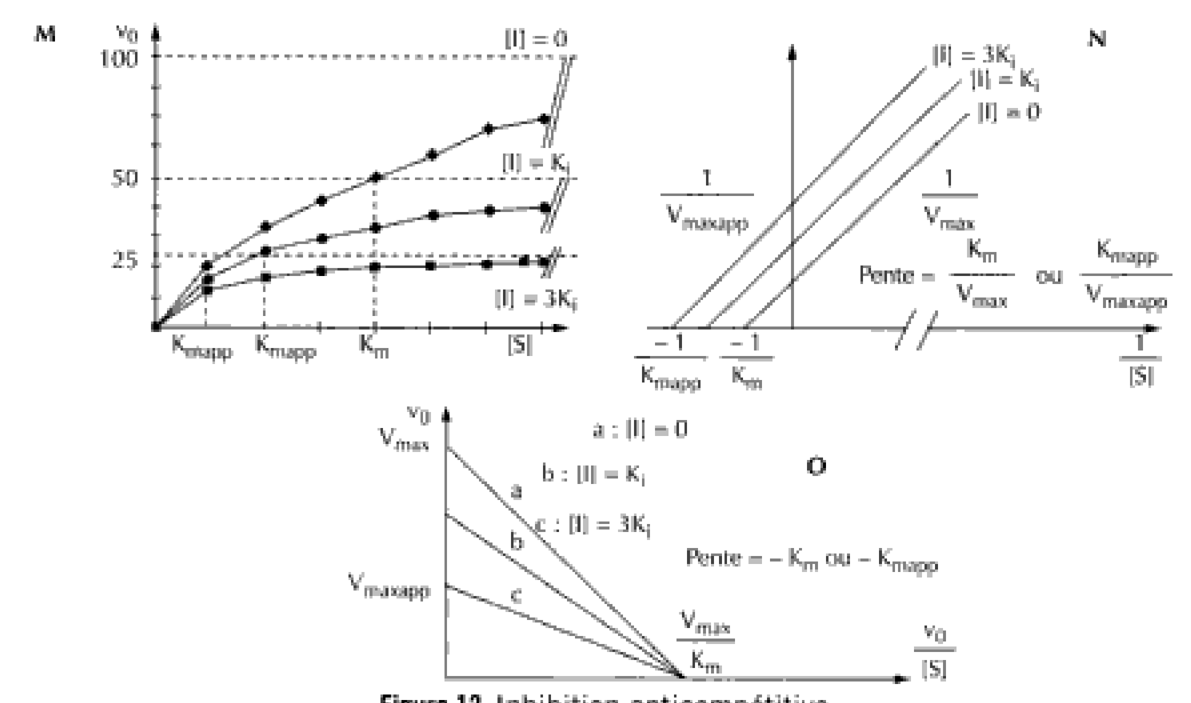



**Figure 12.** Inhibition anticompétitive

## B. Inhibiteurs réversibles à interaction lente et/ou haute affinité

### 1. Inhibiteurs réversibles à haute affinité : tight binding inhibitors (TBI)

- Dans ce modèle, l'équilibre est très rapidement atteint. La constante de vitesse d'association $k_{on}$ du complexe EI est augmentée tandis que la constante de vitesse de dissociation $k_{off}$ est normale ou diminuée). Il en résulte un $K_i$ très faible ($< 10^{-9}$ M). En général, pour les études cinétiques, on utilise des concentrations d'inhibiteur de l'ordre du $K_i$. Ainsi, lorsque $K_i$ est très faible, $(I)_0$ est très faible, de l'ordre de grandeur de $(E)_t$ et $(I) = (I)_0 - (EI)$ n'est plus assimilable à $(I)_0$.
- Exemple d'inhibiteur à forte affinité : le méthotrexate analogue du dihydrofolate (FH2) est IC de la dihydrofolate réductase (DHFR) avec un $K_i = 6.10^{-11}$ M et une demi-vie de plusieurs heures.

### 2. Inhibiteurs réversibles à interaction lente : slow binding inhibitors (SBI)

Dans ces modèles, les formation et dissociation du complexe EI sont relativement lentes et l'état stationnaire n'est atteint qu'au bout de plusieurs secondes, minutes ou heures, au lieu de fractions de secondes pour les I rapidement réversibles. Les constantes de vitesse $k_{on}$ et $k_{off}$ sont diminuées et, selon la valeur de leur rapport, $K_i$ sera normal (*SBI*) ou très faible (*slow and tight binding inhibitors : STBI*).

- *SBI* : $k_{on}$ et $k_{off}$ sont diminués dans des rapports voisins et $K_i$ est normal (# $10^{-6}$ M). Le complexe EI se forme lentement, mais se dissocie aussi lentement.
- *STBI* : $k_{off}$ est plus diminuée que $k_{on}$, et donc $K_i$ est très faible $< 10^{-9}$ M. Le complexe EI se forme lentement mais se dissocie encore plus lentement.

## C. Inhibition irréversible

Alors que pour les I réversibles $K_i$ est le meilleur indice d'efficacité de l'inhibition, pour les I irréversibles on utilise plutôt la constante d'inactivation $k_{inac}$ et parfois $K_i$. Ces inhibiteurs irréversibles se caractérisent par :

- une réaction stoechiométrique de I avec E ;
- une protection partielle par S ;
- une cinétique de pseudo ordre 1 pour la perte d'activité ;
- E demeure inactive après élimination d'I (par dialyse).

Les inhibiteurs irréversibles sont classés selon leur mode d'action en deux catégories principales.

### 1. Inhibiteurs réagissant d'emblée avec le site substrat : marqueur d'affinité (active site directed irreversible inhibitors)

Ce sont des analogues de substrat possédant une fonction réactive susceptible de réagir avec une fonction nucléophile du site de fixation de S.

Ces inhibiteurs sont assez peu intéressants comme médicaments car :

- leur affinité est souvent faible ⇒ doses élevées pour obtenir un effet thérapeutique ;
- du fait de leur réactivité intrinsèque, des réactions et donc des effets secondaires imprévisibles sont possibles avec d'autres protéines ⇒ toxicité.

### 2. Inhibiteurs réagissant avec le site catalytique : substrat « suicides », « mechanism based inhibitors »

#### a) Définition

Ce sont des analogues de substrat sans fonction réactive d'emblée. Après l'étape de liaison à l'enzyme, ils sont transformés par les propriétés catalytiques de l'enzyme (étape $k_{cat}$) avec création *de novo* d'une fonction réactive qui va ensuite permettre la liaison covalente de I sur une fonction nucléophile du centre actif de l'enzyme.

Avantages et inconvénients :

- ces I suicides connaissent un grand succès comme médicament car ils sont très sélectifs (par les étapes de fixation et de catalyse) et donnent donc peu d'effets secondaires ;

- mais l'espèce réactive EI* est susceptible d'être libérée prématurément du centre actif avant formation de la liaison covalente avec E.

### b) Cinétique

$$E + I \Leftrightarrow EI \xrightarrow{k_{inac}} [(EI^*) \rightarrow E - I]$$

L'inactivation de E suit une cinétique de pseudo ordre 1.

$$v = \frac{d(E-I)}{dt} = k_{inac}(EI) \text{ avec } (EI) = (E)_t - (E-I) - (E) = (E)_t - (E-I) - K_i\frac{(EI)}{(I)}$$

$$(EI) = \frac{(E)_t - (E-I)}{\left[1 + \frac{K_i}{(I)}\right]} \Rightarrow v = \frac{d(E-I)}{dt} = k_{inac}\frac{(E)_t - (E-I)}{\left[1 + \frac{K_i}{(I)}\right]} \text{ que l'on peut écrire :}$$

$$\frac{d(E-I)}{(E)_t - (E-I)} = k_{obs}dt \text{ avec } k_{obs} = \frac{k_{inac}}{\left[1 + \frac{K_i}{(I)}\right]} \quad \text{et} \quad \frac{1}{k_{obs}} = \frac{1}{k_{inac}} + \frac{K_i}{k_{inac}}\frac{1}{(I)}$$

On constate que $k_{obs} \rightarrow 0$ quand $(I) \rightarrow 0$ et que $k_{obs} \rightarrow k_{inac}$ quand $(I) \rightarrow \infty$.

Après intégration :

$$\ln\frac{(E)_t - (E-I)}{(E)_t} = -k_{obs}t = \ln\frac{A}{A_0}. \tag{23}$$

A étant l'activité enzymatique résiduelle que l'on peut exprimer en pourcentage de l'activité enzymatique totale $A_0$.

### c) Représentation

- les concentrations de E, S et I à t = 0 sont définies : le logarithme de l'inactivation de E par I en fonction du temps suit une décroissance linéaire de pente $-k_{obs}$ ou $-k_{obs}/2,3$ en fonction du choix du logarithme.
- pour une concentration en E et S fixée : lorsque (I) augmente, on obtient une famille de droites, de pentes $k_{obs}$ croissantes et tendant vers un maximum $k_{inac}$.

la représentation secondaire de $1/k_{obs} = f[1/(I)]$ permet de calculer $k_{inac}$ et $K_i$.

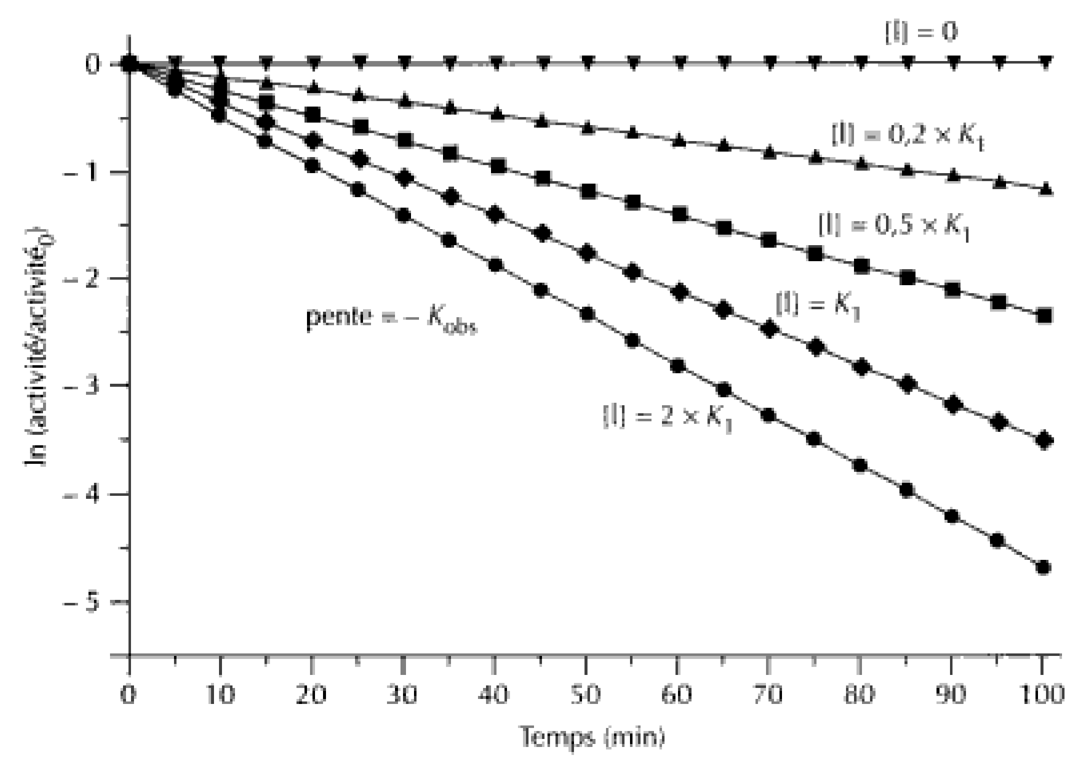



**Figure 13.** Inhibition irréversible, cinétique d'inactivation

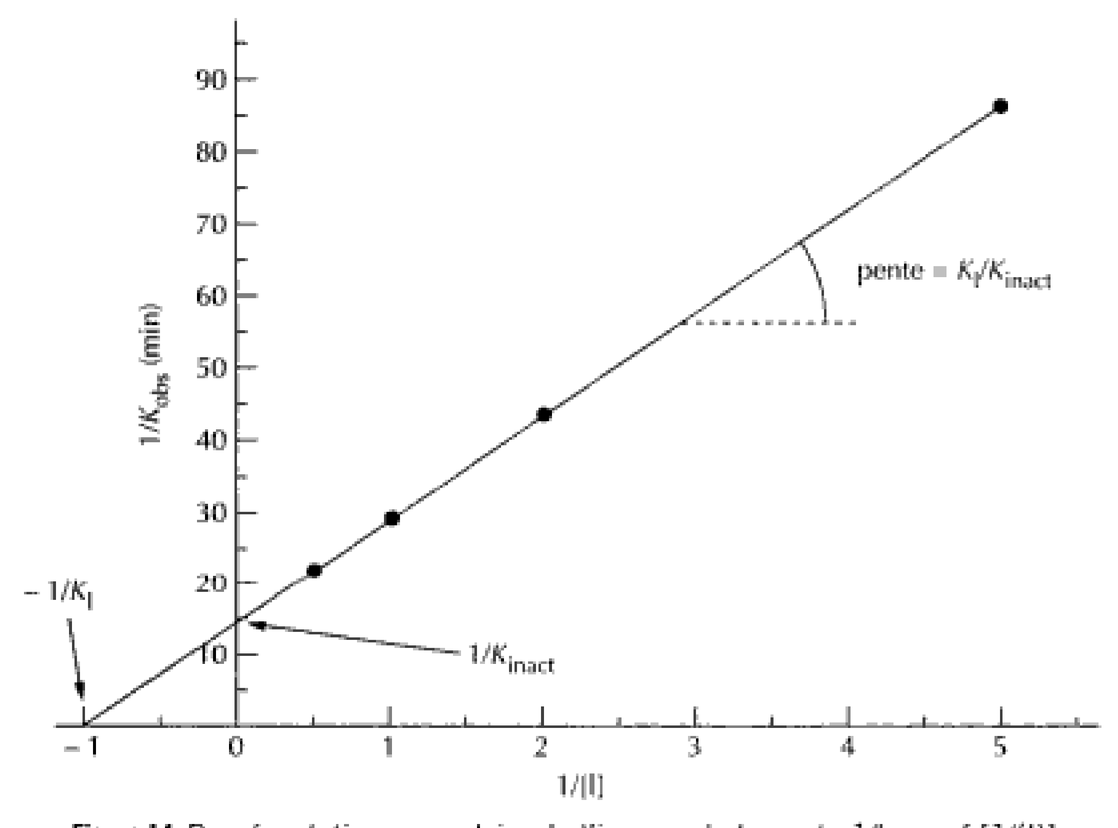



**Figure 14.** Représentation secondaire de l'inverse de la pente $1/k_{obs} = f\,[1/(I)]$

# L'essentiel de la question

Les enzymes sont des protéines dont la fonction biologique est la catalyse des réactions du métabolisme du vivant. L'activité catalytique de l'enzyme ou « **activité enzymatique** » est le plus souvent mesurée par la **vitesse initiale** ou $\mathbf{v_0}$ de la réaction catalysée, i.e., absence du produit de la réaction. Pour le pharmacien biologiste les applications de la mesure de $\mathbf{v_0}$ sont triples :

- mesure indirecte en conditions conventionnelles $[v_0 = K \cdot (E)_t]$ de la concentration d'une enzyme $(E)_t$. Cette concentration est exprimée en unités arbitraires, l'**Unité** ou le **katal**, exprimant le travail de catalyse réalisé par l'enzyme.
- mesure en conditions conventionnelles $[v_0 = K' \cdot (S)_0]$ d'une concentration en substrat.
- mesure de l'efficacité et du mode d'action d'un médicament inhibiteur d'enzyme.

**La première partie** de cette question étudie la réaction enzymatique dans des conditions de vitesse initiale, i.e., irréversibles, sur un modèle simplifié à un seul substrat et en déduit la relation fondamentale de Henri et Michaelis-Menten (HMM). Cette relation conditionne les trois applications ci-dessus. Quatre représentations graphiques de l'équation de HMM sont proposées : une représentation hyperbolique et 3 représentations linéaires. Elles permettent de mesurer KM et Vmax mais aussi de déterminer pour les inhibiteurs rapidement réversibles le mode d'action de l'inhibiteur.

**La deuxième partie** étudie la réaction enzymatique dans des conditions de réversibilité et toujours sur le même modèle simplifié à un substrat. Ces conditions sont plus représentatives des nombreuses réactions enzymatiques *in vivo* que les conditions de vitesse initiale que l'on observe plutôt *in vitro*. L'équation de la vitesse nette de la réaction démontre que le substrat et le produit se comportent comme des inhibiteurs compétitifs mutuels. À l'équilibre la vitesse nette de la réaction étant nulle, on en déduit une expression de la constante d'équilibre qui est égale au rapport des rapports $(Vmax/K_M)$ de la réaction dans les sens aller et retour (relation de Haldane). D'une façon plus générale, l'étude de la liaison entre une protéine et son ligand spécifique à l'équilibre aboutit à la relation de Scatchard qui permet, par une représentation graphique, la mesure d'une part des constantes de dissociation (ou d'affinité) de la protéine pour son ligand et d'autre part du nombre n de sites de liaison par molécule de protéine. En particulier pour les enzymes cette relation s'applique à tout équilibre avec un effecteur spécifique, e.g., substrat, activateur, inhibiteur.

**La troisième partie** aborde l'inhibition de la réaction enzymatique.

- Les trois modèles classiques d'inhibitions rapidement réversibles (inhibitions compétitives, non compétitives et anti-compétitives) sont détaillés. D'autres modèles d'inhibition rapidement réversible, un peu plus complexes mais peut-être plus fidèles à la réalité (inhibitions partielles et mixtes), ne sont pas abordés car non traités dans le cursus universitaire de base.
- En revanche d'autres types d'inhibitions, bien que ne sont pas traités dans le cursus de base, sont ici présentés et partiellement développés car ils sont à la base de la conception de nombreux médicaments récents plus performants dans leur demi-vie et dans leur spécificité. Ce sont les inhibiteurs réversibles à haute affinité et/ou à interaction lente et les inhibiteurs irréversibles du type « inhibiteurs suicides ».

# Physiologie

# Physiologie rénale

F. SCHMITT, Laboratoire de biologie, Centre hospitalier de Bretagne Sud, Lorient.

*L'homéostasie du milieu intérieur est en majeure partie assurée par le rein en raison de sa remarquable structure. En effet, grâce à la disposition particulière et au fonctionnement intégré des unités fonctionnelles élémentaires le composant, les néphrons, il participe à la régulation du volume et de la composition des liquides corporels en contrôlant l'excrétion d'eau, d'électrolytes et d'ions $H^+$, et en assurant l'élimination de certains déchets du métabolisme azoté comme l'urée et l'acide urique. Le rein est également la cible de nombreux médiateurs hormonaux. En outre, il possède une véritable fonction endocrine puisqu'il synthétise des facteurs hormonaux agissant sur lui-même ou sur des organes cibles. Par cette fonction endocrine, le rein participe à la régulation de la pression artérielle (système rénine-angiotensine-aldostérone), du métabolisme phosphocalcique (hydroxylation du 25 hydroxycholécalciférol), de l'érythropoïèse (synthèse de l'érythropoïétine), de la vasomotricité (synthèse de médiateurs vasoactifs : prostaglandines, bradykinine).*

# I. Organisation du rein

Une meilleure compréhension de la physiologie rénale va de pair avec une meilleure connaissance de la structure anatomique du rein. Les reins, situés dans la partie supérieure de la fosse lombaire, ont la forme d'un haricot, comportant un bord externe convexe et un bord interne concave marqué par le hile rénal. Le poids d'un rein chez l'homme adulte est de 150 g environ. Entouré d'une capsule fibreuse lisse, le parenchyme est formé de deux régions macroscopiquement distinctes : le cortex, en périphérie, et la médullaire, au centre. La médullaire elle-même est divisée en deux régions, une région externe faisant suite au cortex et une région interne. Le rein humain est composé d'environ un million d'unités fonctionnelles excrétrices, ou néphrons, indépendantes les unes des autres, contenues dans un tissu interstitiel de soutien où se trouvent également les vaisseaux et les nerfs intrarénaux. La disposition des néphrons et des vaisseaux explique la conformation du rein, les domaines d'échanges entre la circulation plasmatique et la circulation urinaire intrarénales, ainsi que certaines fonctions fondamentales comme le processus de concentration-dilution urinaire.

## A. Structure du néphron

Chaque néphron se compose de deux parties : le glomérule et le tube rénal.

### 1. Glomérule (*fig. 1*)

C'est une sphère creuse comprenant une enveloppe, la capsule de Bowman, et un système de capillaires glomérulaires, le floculus. Entre ces deux éléments se trouve l'espace de Bowman communiquant avec la lumière du tube contourné proximal et dans lequel s'écoule l'ultrafiltrat glomérulaire. Le glomérule possède donc deux pôles : un pôle urinaire s'ouvrant sur le tube contourné proximal et un pôle vasculaire par lequel pénètre l'artériole afférente et ressort l'artériole efférente. Entre les deux artérioles, les capillaires glomérulaires forment un système porte artériel par lequel

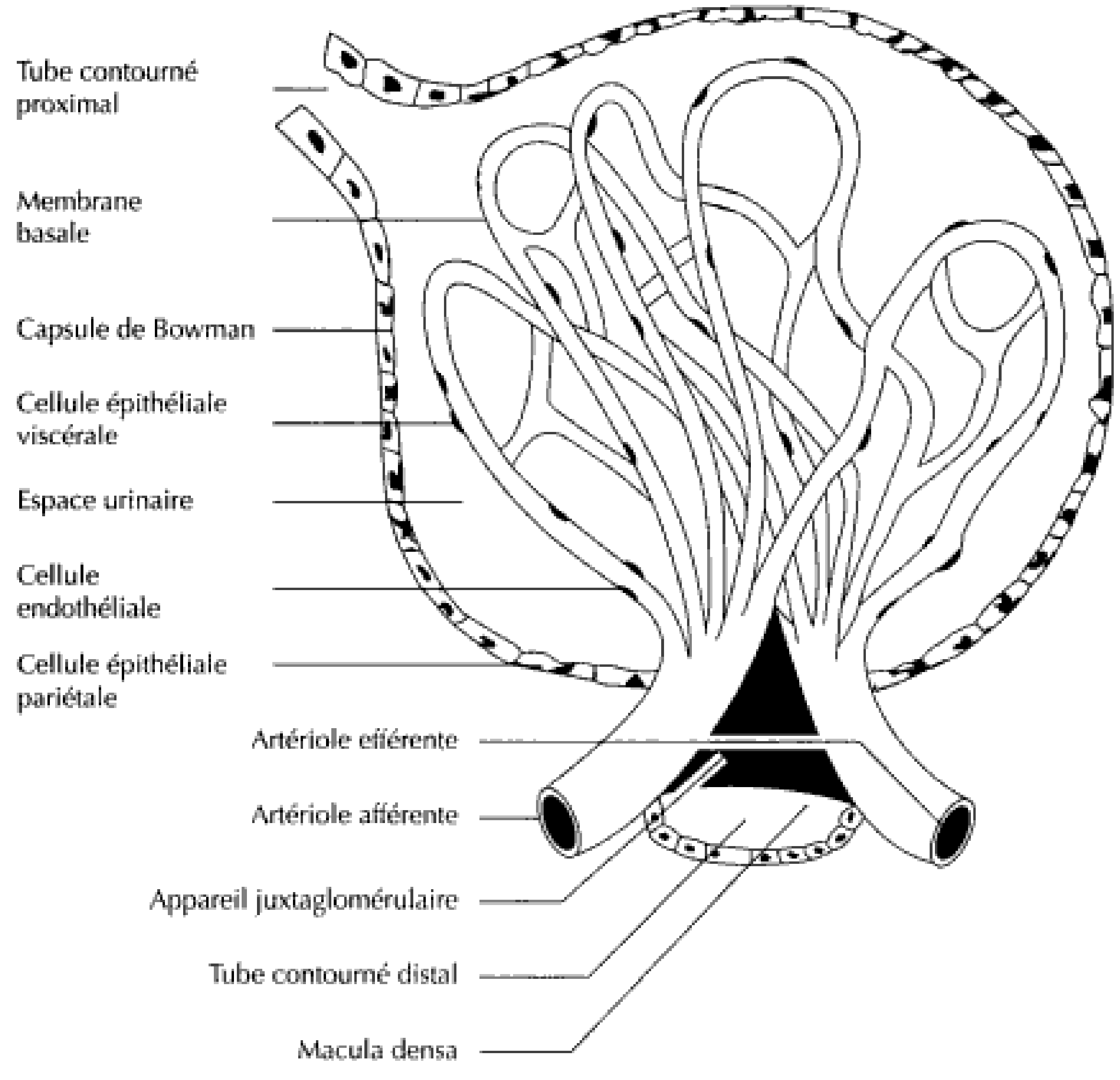



**Figure 1.** Disposition schématique du glomérule rénal

passe la totalité du débit sanguin rénal, soit 20 % du débit cardiaque. La destinée de l'artériole efférente est différente selon la situation du glomérule : irrigation des tubules (capillaires péritubulaires) ou irrigation de la zone médullaire (vasa recta).

## 2. Tube urinifère (*fig.* 2)

Il est constitué d'un épithélium polarisé reposant sur une membrane basale. Le pôle apical de ces cellules épithéliales est en rapport avec la lumière du tube urinaire alors que le pôle basolatéral est en rapport avec les capillaires péritubulaires. Le tube urinifère est subdivisé en plusieurs segments :

- le tube proximal, lui-même composé de deux parties, une partie contournée adjacente au glomérule et une partie droite ou « pars recta » ;
- l'anse de Henlé, composée de l'anse grêle descendante, de l'anse grêle ascendante et de la branche large ascendante ;
- le tube contourné distal. Le tube distal de chaque néphron entre en contact avec le pôle vasculaire de son glomérule formant l'appareil juxtaglomérulaire ;
- le tube collecteur, qui comprend trois parties :
  - le tube collecteur cortical ;
  - le tube collecteur de la médullaire externe ;

– le tube collecteur de la médullaire interne, ou « tube de Bellini », résultant de la fusion de plusieurs canaux collecteurs s'ouvrant au niveau de la papille et conduisant l'urine définitive à l'entrée des calices.

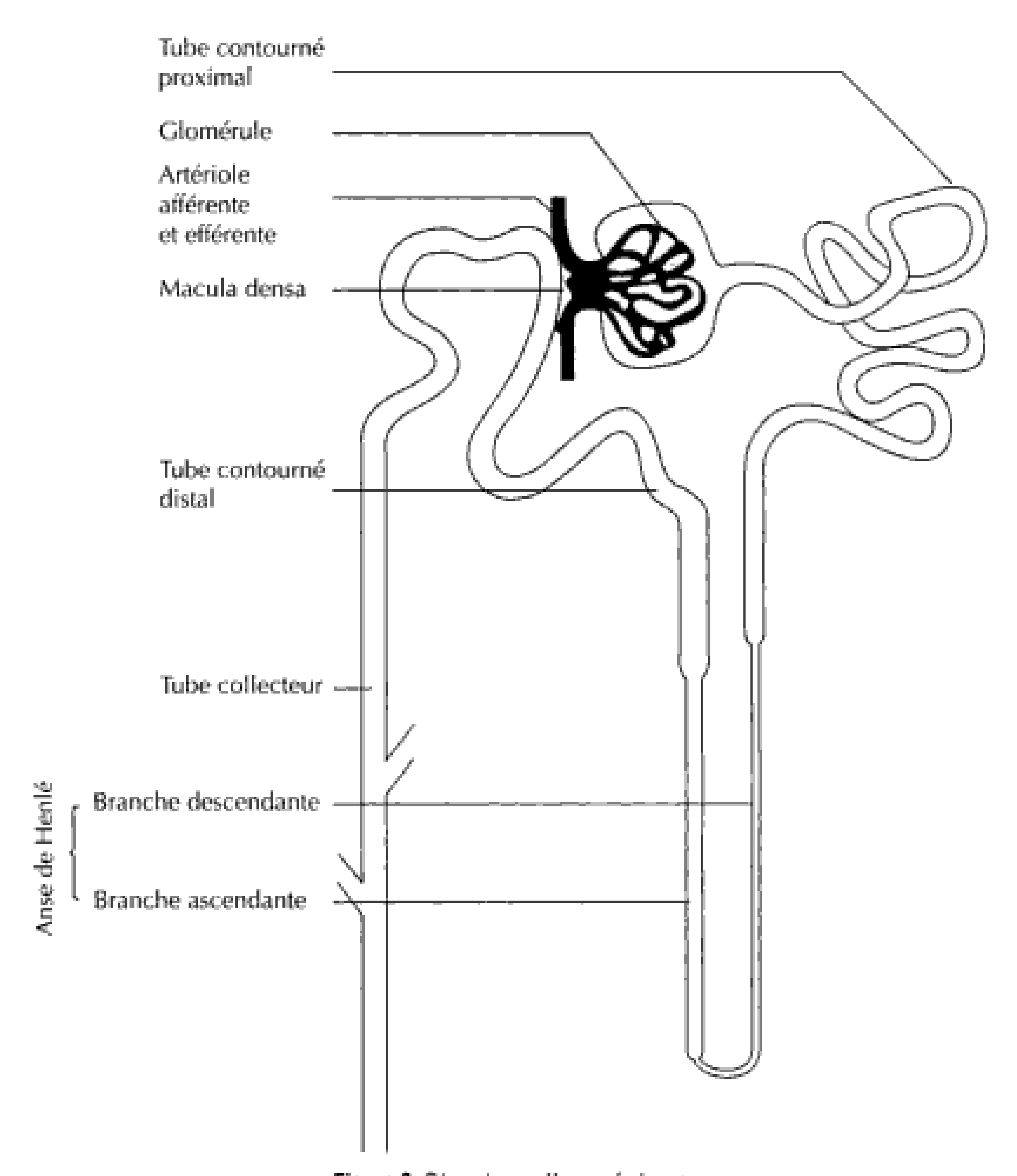



**Figure 2.** Structure d'un néphron

## B. Topographie du néphron et vascularisation

Le cortex rénal contient les glomérules et les tubes contournés proximaux et distaux. Ces derniers sont irrigués par les capillaires péritubulaires issus de l'artériole efférente du glomérule correspondant. Les autres parties du tube urinifère se situent dans la médullaire où ils forment une boucle plus ou moins profonde. Entre les branches de l'anse de Henlé cheminent parallèlement des vaisseaux droits, ou « vasa recta », issus des artérioles efférentes et cette disposition particulière joue un rôle important dans les échanges à contre-courant décrits ultérieurement et permettant entre autres le recyclage de l'eau et de l'urée.

# II. Vascularisation rénale et filtration glomérulaire

## A. Notion de clairance

La clairance est un concept important en physiologie rénale permettant d'établir le rapport entre la quantité d'une substance fournie au rein et la quantité éliminée par le rein. La clairance d'une substance représente le volume virtuel de sang ou de plasma totalement épuré de cette substance par unité de temps. C'est un volume théorique. La formule générale d'une clairance pour une substance éliminée par le rein :

$$C = (U \cdot V)/P$$

C = clairance de la substance considérée en ml/mn ou ml/s. Chez l'homme, pour permettre des comparaisons de clairances entre des sujets de poids et de taille différents (tout particulièrement chez l'enfant), la clairance est rapportée à 1,73 $m^2$ de surface corporelle.
U = concentration urinaire de la substance en mmol/L.
P = concentration plasmatique de la substance en mmol/L.
V = volume d'urine émise en ml/min (débit).
Cette définition n'est valable que pour les substances plasmatiques qui ne sont ni métabolisées, ni dégradées, ni synthétisées par le rein. Cette notion de clairance peut être étendue à toutes les substances que le rein élimine. La clairance d'une substance reflète l'épuration globale de cette substance sans préjuger des mécanismes intrarénaux. Les trois grandes fonctions du néphron, filtration, sécrétion et réabsorption, sont étudiées à partir d'épreuves fondées sur la notion de clairance. L'utilisation de substances uniquement filtrées au niveau du glomérule (inuline) permet de déterminer le débit de filtration glomérulaire. Lorsqu'une substance a une valeur de clairance inférieure à la filtration, on peut supposer une réabsorption tubulaire (glucose). Si elle a une clairance supérieure, on admet un processus de sécrétion tubulaire (acide para-aminohippurique ou PAH).

## B. Filtration glomérulaire

La filtration glomérulaire représente la première étape de la formation de l'urine. Une fraction (20 %) du plasma circulant dans les capillaires glomérulaires filtre à travers la structure complexe de la paroi capillaire formant l'urine primitive dans l'espace de Bowman, s'écoulant ensuite dans le tube proximal. Le glomérule est une structure spécialisée faite de capillaires sanguins et dont l'endothélium est en étroite relation avec l'épithélium rénal. Au total, le plasma est filtré à travers une structure formée de trois couches successives : les cellules endothéliales des capillaires, la membrane basale et les cellules épithéliales viscérales ou podocytes. L'urine primitive résultant de cette filtration possède deux caractéristiques essentielles :

- d'une part, une identité presque parfaite avec le plasma pour certains caractères physico-chimiques comme le pH, la concentration des différents ions, urée, glucose…

- d'autre part, une faible concentration de protéines de l'ordre de 200 à 300 mg/L. Il s'agit donc d'un ultrafiltrat plasmatique d'un débit d'environ 120 ml/mn chez l'homme.

La nature des substances composant cet ultrafiltrat est déterminée par le caractère sélectif de la membrane basale du glomérule. Une sélectivité en fonction de la taille de la substance : la membrane glomérulaire possède une perméabilité élevée pour l'eau et les solutés de petite taille, mais faible pour les molécules les plus grosses. Les molécules de poids moléculaire inférieur à 5 000 daltons (inuline), à condition de ne pas être liées aux protéines, traversent la membrane glomérulaire librement et se retrouvent dans l'ultrafiltrat à une concentration identique à celle du plasma. À l'inverse, les molécules de poids moléculaire supérieur à 70 000 daltons (*cut off*) sont presque retenues en totalité. En dehors de la taille des molécules, la membrane basale possède également une sélectivité en fonction de la charge électrique des substances : elle possède des charges électriques négatives tendant à repousser les protéines elles-mêmes chargées négativement au pH plasmatique physiologique. La filtration glomérulaire semble être le résultat de deux processus.

- *Filtration (transfert de solutés et de solvant au travers d'une membrane perméable sous l'influence d'un gradient de pression)* : un processus de simple filtration à travers une membrane poreuse rendant compte de la majorité des phénomènes. La filtration glomérulaire est déterminée par l'équilibre des pressions de part et d'autre de la paroi du capillaire glomérulaire. La résultante ou « pression efficace de filtration » (Pf) est la somme algébrique de ces différentes forces favorisant ou s'opposant à la filtration. On peut écrire l'équation suivante :

  $$Pf = Pcg - [Po + Pt] \text{ en mmHg}$$

  Pcg = pression hydrostatique moyenne dans le capillaire glomérulaire favorisant la filtration.
  Po = pression colloïdale osmotique due aux protéines plasmatiques s'opposant à la filtration.
  Pt = pression hydrostatique tubulaire s'opposant à la filtration.

  À pression efficace de filtration donnée, la filtration glomérulaire dépend également de la perméabilité des capillaires glomérulaires. Celle-ci conditionne en effet le débit du filtrat glomérulaire et la nature des substances composant l'urine primitive. La perméabilité des capillaires glomérulaires est reflétée par le coefficient d'ultrafiltration Kf (ce coefficient est fonction de la perméabilité hydraulique de la membrane et de la surface de filtration). La valeur du Kf des capillaires glomérulaires est très élevée par rapport à celle des autres territoires expliquant l'importance de la filtration malgré une pression efficace de filtration relativement faible. Le débit de filtration glomérulaire dépend, outre du nombre de néphrons fonctionnels, de la pression artérielle (en cas de choc, diminution de la diurèse), de la surface de filtration, de la perméabilité des glomérules et du débit sanguin traversant le glomérule.

- *Diffusion (transfert passif de solutés au travers d'une membrane sous l'influence d'un gradient de concentration)* : un phénomène de diffusion (la paroi capillaire se comportant comme un gel hydraté non percé de pores) interviendrait également pour expliquer le débit élevé de la filtration glomérulaire.

Le volume d'urine primitive formé chaque jour au niveau du glomérule est en effet de 150 à 200 l, dont 99 % seront réabsorbés au niveau tubulaire pour aboutir aux 1 500 ml/24 heures d'urine définitive. La mesure du débit de filtration glomérulaire peut s'effectuer à l'aide d'une substance librement filtrée à travers les glomérules, ni réabsorbée, ni sécrétée au niveau tubulaire, non catabolisée par le rein et ne s'accumulant pas dans le parenchyme rénal. L'inuline, polymère du fructose, correspond à une telle substance et sa concentration dans l'ultrafiltrat est identique à celle du plasma. La clairance de l'inuline représente la méthode de référence pour déterminer le débit de filtration glomérulaire. Sa valeur est d'environ 120 ml/mn/ 1,73 $m^2$ de surface corporelle, soit une filtration glomérulaire de 180 l/24 h. Cette clairance est stable quelle que soit la concentration plasmatique de l'inuline. Cette technique n'est plus guère utilisée en pratique courante car elle présente certains inconvénients : nécessité d'une perfusion afin d'obtenir un taux plasmatique constant et technique de dosage difficilement automatisable. En pratique clinique, on utilise plutôt la clairance de la créatinine endogène, mesurée sur 24 heures ou estimée à l'aide de la formule de Cockroft et Gault (voir « *Pathologie rénale* ») ou, encore plus récemment, la détermination de la cystatine C plasmatique.

## C. Circulation rénale

Le rein est un organe richement vascularisé. Au niveau des capillaires glomérulaires (« floculus »), s'effectue l'ultrafiltration du sang. Les capillaires péritubulaires remplissent une double fonction : ils sont le siège des processus de réabsorption et de sécrétion tubulovasculaire d'une part et, d'autre part, ils assurent l'apport des substrats énergétiques aux différentes structures tissulaires du rein.

Chez l'homme, le débit sanguin rénal est de 1 200 ml/mn, soit 20 % du débit cardiaque au repos. Près de 90 % de ce débit sanguin sont dirigés vers le cortex, c'est-à-dire au niveau de l'artériole afférente des glomérules pour la filtration. Seulement 20 % du débit plasmatique rénal sont filtrés à travers les capillaires glomérulaires. C'est la fraction de filtration.

Le rein a la capacité de maintenir constant son débit sanguin malgré des variations aiguës de la pression artérielle comprises entre 80 et 140 mmHg : on parle d'autorégulation rénale. Le mécanisme de contrôle existe au niveau du rein lui-même, reposant sur une adaptation des résistances vasculaires, impliquant d'une part les fibres sympathiques adrénergiques et, d'autre part, l'intervention de l'appareil juxtaglomérulaire avec stimulation ou inhibition du système rénine-angiotensine. C'est le rétrocontrôle glomérulotubulaire Toute augmentation de la filtration glomérulaire entraîne une augmentation du débit urinaire au niveau du tube distal conduisant à une stimulation du système rénine-angiotensine et une réduction du débit de filtration glomérulaire.

Le flux sanguin rénal, quantité de sang passant dans le rein en une minute, est mesuré par la clairance du PAH (acide para-aminohippurique) qui est une substance exogène entièrement libre dans le plasma, non liée aux protéines et aux globules rouges, et entièrement éliminée dans les urines par addition d'une filtration glomérulaire et d'une sécrétion tubulaire proximale. On peut donc écrire pour le flux plasmatique rénal (FPR) :

$$FPR = (U \cdot V)/(Pa - Pv)$$

U = concentration du PAH urinaire.
V = débit urinaire.
Pa = concentration du PAH dans le plasma artériel rénal.
Pv = concentration du PAH dans le plasma veineux rénal.
Or le PAH, aux faibles concentrations plasmatiques, est extrait du plasma à 90 % au cours de son passage dans le rein.
Coefficient d'extraction du PAH :

$$EPAH = (Pa - Pv)/Pa = 0{,}9.$$

Si l'extraction est normale, le sang veineux ne contient que 10 % de la concentration artérielle, taux négligeable permettant d'éviter le recours au dosage du PAH par cathétérisme dans la veine rénale. On peut donc écrire :

$$FPR = (U \cdot V)/Pa = \text{clairance PAH}.$$

Le flux plasmatique rénal est de 600 ml/mn pour les deux reins. Si on tient compte d'un hématocrite à 50 %, le flux sanguin rénal est de 1 200 ml/mn.
Si l'extraction du PAH est abaissée (lors d'une insuffisance rénale par exemple), il est nécessaire de déterminer la concentration du PAH dans la veine rénale et de corriger la valeur de la clairance par le coefficient d'extraction. On a alors :

$$FPR = CPAH/EPAH.$$

## III. Fonctions tubulaires

Le processus de filtration glomérulaire aboutit donc à la formation de près de 180 litres par 24 heures de filtrat glomérulaire ou urine primitive, soit quatre fois la masse d'eau totale de l'organisme. L'excrétion de tout le filtrat glomérulaire est incompatible avec la vie, et la fonction primordiale du rein est donc de réabsorber. Le rôle du tube rénal est double. D'une part, il doit réabsorber de la lumière tubulaire vers le plasma péritubulaire, puis la circulation systémique la majeure partie de l'eau et des substances dissoutes filtrées essentielles au maintien de la composition du milieu intérieur. Ainsi, à l'état normal, le tube urinifère réabsorbe plus de 99 % de l'eau et des électrolytes et substances filtrés. D'autre part, le tubule doit permettre l'élimination des produits de dégradation du métabolisme et éventuellement des substances exogènes comme les médicaments. Il le fait, soit en combinant filtration et sécrétion tubulaire (par exemple, l'acide urique et la plupart des médicaments), soit par sécrétion tubulaire exclusive lorsque ces produits sont filtrés en quantité négligeable (par exemple, les ions $H^+$). La sécrétion correspond au transfert de substances à partir du plasma péritubulaire ou de la cellule tubulaire vers la lumière tubulaire. Ces fonctions de transport, réabsorption et sécrétion, sont assurées par deux types de mouvements, passifs ou actifs.
*Les mouvements passifs* : ils ne nécessitent aucune dépense d'énergie, ils se font par diffusion le long d'un gradient de concentration chimique ou de potentiel électrique entre urine et cellule tubulaire ou entre cellule tubulaire et plasma péritubulaire. C'est par exemple le cas de l'urée qui est réabsorbée passivement, essentiellement au niveau du tube proximal.

*Les mouvements actifs* : ils s'effectuent contre une barrière énergétique (gradient électrique, chimique ou électrochimique), à l'aide de systèmes de transport nécessitant de l'énergie pour leur fonctionnement. On distingue deux types de transport actif :

- *les transports actifs primaires*, qui sont définis par le couplage entre un transporteur et une réaction exergonique (dégradation ATP) et permettent le transport ascendant d'un milieu moins énergétique à un milieu plus énergétique, par exemple la Na/K-ATPase ;
- *les transports secondairement actifs* au cours desquels deux ou plusieurs substrats sont couplés à un transporteur membranaire et où l'énergie dissipée dans le sens descendant pour le transport d'un substrat sert au transport du second dans le sens ascendant (par exemple Na/H et Na/K/2Cl).

Ces transporteurs peuvent être neutres (1 ion entrant pour 1 ion sortant) ou électrogéniques (1 ion entrant pour plusieurs ions sortants) générant alors une différence de potentiel électrique.

*Remarque* : on parle de contre-transport pour un transporteur couplant le transport des substrats en sens inverse et de cotransport pour celui couplant le passage des substrats dans le même sens (ex. Na/Glc).

La dépense d'énergie nécessaire à ce fonctionnement se traduit par une consommation d'oxygène. De plus, la plupart de ces systèmes sont saturables et l'on définit un transport maximum (Tm) pour une substance limitant son transport actif. Le glucose représente le type de la substance filtrée dont la réabsorption active est limitée par un Tm. À l'état normal, tout le glucose filtré est réabsorbé de façon active au niveau du tube proximal et l'urine normale ne contient pas de glucose. Lorsque la glycémie s'élève, à partir d'une certaine concentration plasmatique, dite « seuil rénal de glucose » (3 g/L soit environ 16 mmol/L), du glucose apparaît dans les urines. Si la glycémie s'élève encore, la quantité de glucose éliminé dans les urines augmente et devient directement proportionnelle à la quantité de glucose filtré : cela signifie que la quantité de glucose réabsorbé est constante et que le Tm glucose est atteint (*fig.* 3).

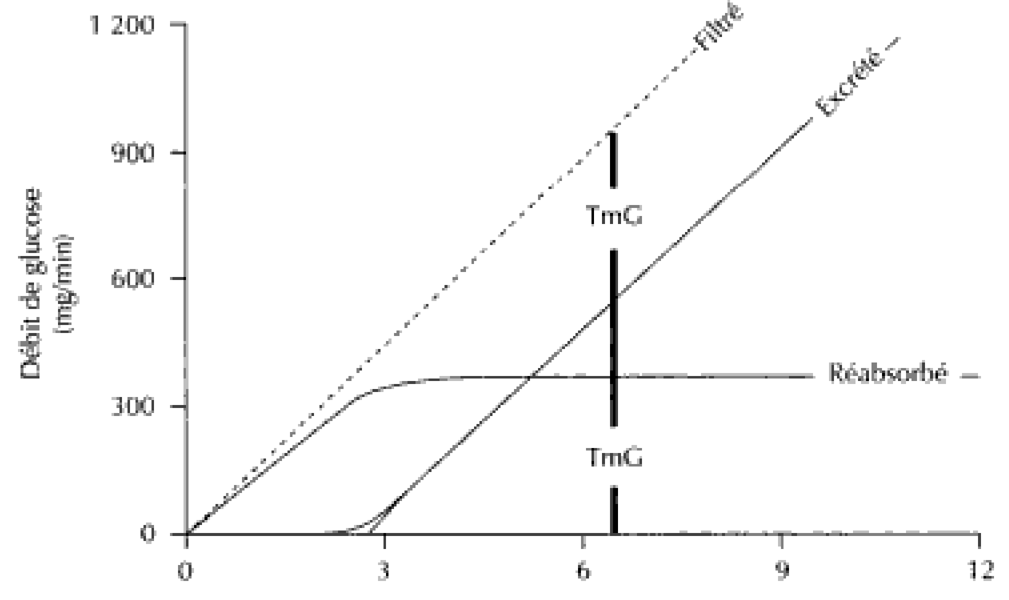



**Figure 3.** Réabsorption et excrétion du glucose chez l'homme en fonction de la glycémie

Qu'il s'agisse de transport passif ou actif, les différents substrats pourront traverser la cellule tubulaire dans le sens fluide tubulaire plasma pour la réabsorption ou dans le sens plasma fluide tubulaire pour la sécrétion. Ces différents systèmes de transport se trouvent donc sur les deux pôles de la cellule tubulaire, le pôle apical côté lumière tubulaire, le pôle basolatéral côté plasma.
Nous étudierons successivement les différentes portions tubulaires avec leurs principales fonctions, mais il est évident que, d'une part, le fonctionnement de chaque segment tubulaire retentit sur celui des segments en aval en agissant sur la composition du fluide tubulaire qui leur est délivré et que, d'autre part, il existe au moyen de la disposition anatomique des interactions directes entre segments longitudinalement adjacents.

## A. Tube proximal

C'est à ce niveau que se produit la réabsorption massive de l'ultrafiltrat glomérulaire. À l'état normal, à la fin du tube proximal, environ 75 % du filtrat glomérulaire sont réabsorbés. À l'inverse, il y a eu sécrétion d'anions et de cations organiques et d'ions ammonium.

### 1. Réabsorption de l'eau et du sodium

60 à 70 % de l'eau et du sodium sont réabsorbés au niveau du tube proximal. Dans la première portion du tube proximal, il existe un certain nombre de transporteurs luminaux couplant la réabsorption du $Na^+$ au transport d'autres substances (*fig.* 4) :
- cotransport glucose/$Na^+$
- cotransport acides aminés/$Na^+$
- cotransport $Na^+$/phosphate
- contre-transport $Na^+$/$H^+$ électroneutre : pour un ion $Na^+$ réabsorbé, un ion $H^+$ est sécrété. Ce système participe à la régulation de l'équilibre acido-basique.

Ces différents systèmes de transport génèrent un gradient électrogénique favorisant la réabsorption passive de $Cl^-$ par les jonctions intercellulaires. Dans la seconde portion du tubule proximal, les différents transporteurs décrits ci-dessous fonctionnent avec une moins grande capacité et le sodium est essentiellement réabsorbé d'une part sous forme de Na Cl par un mécanisme actif dépendant de la Na/K-ATPase basolatérale et, d'autre part, par diffusion simple au niveau des espaces intercellulaires. La réabsorption de l'eau se fait de manière passive, secondairement à celles des substances dissoutes. On considère qu'au niveau du tube proximal la réabsorption est iso-osmotique, les ions et l'eau étant réabsorbés dans les mêmes proportions et que, par conséquent, le liquide réabsorbé a la même osmolalité que le liquide tubulaire restant.

### 2. Réabsorption des bicarbonates

Environ 85 % des bicarbonates filtrés sont réabsorbés au niveau du tube proximal en se combinant avec des ions $H^+$ sécrétés par le tube. La réabsorption des bicarbonates n'est pas sans limites. Pour des concentrations plasmatiques supérieures à

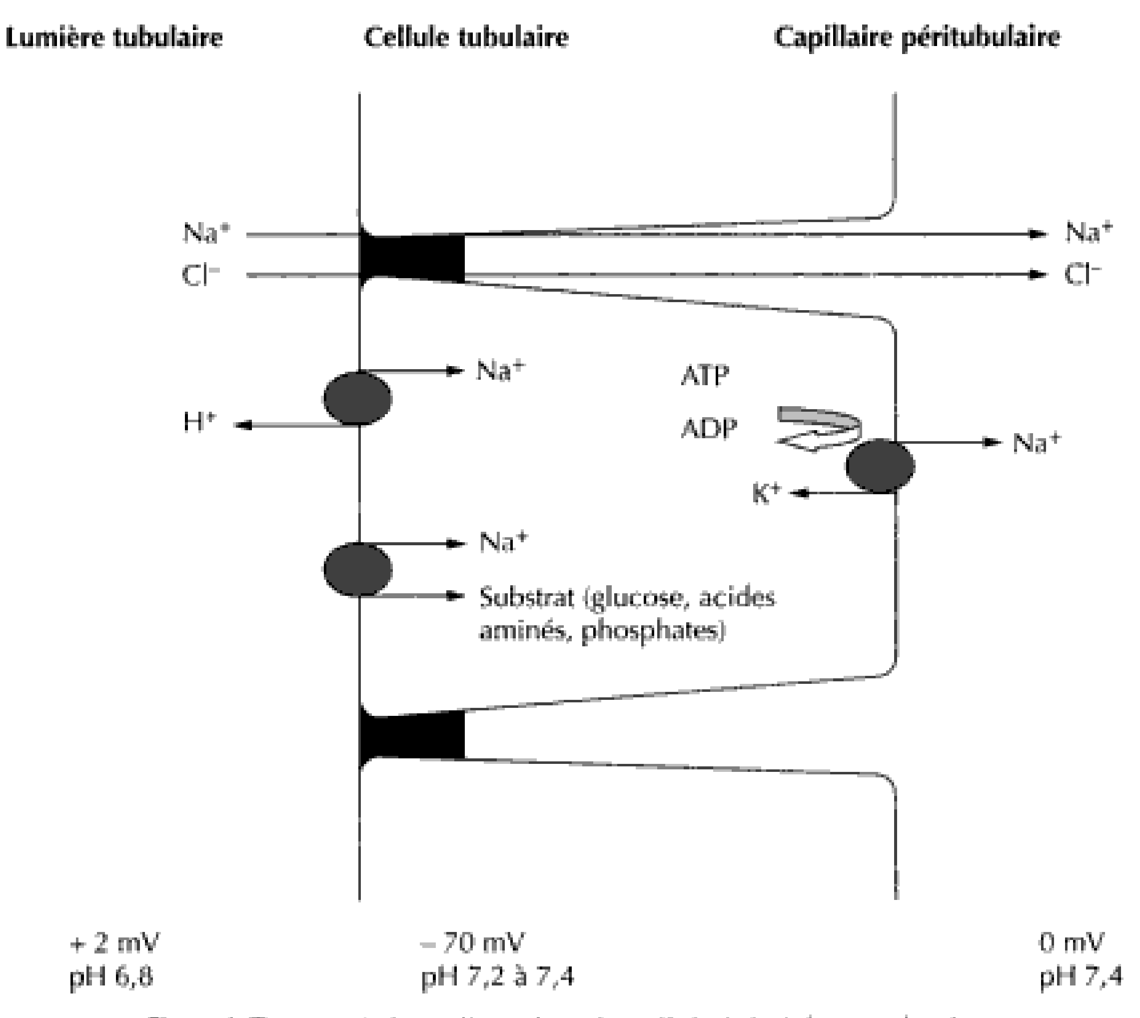



**Figure 4.** Transport du sodium dans la cellule tubulaire proximale

27 mmol/L, des bicarbonates apparaissent dans les urines (seuil rénal des bicarbonates). Nous reverrons ultérieurement en détail les mécanismes de réabsorption des bicarbonates dans le chapitre consacré à la régulation de l'équilibre acido-basique par le rein.

## 3. Réabsorption du glucose et des acides aminés

La totalité du glucose et des acides aminés filtrés est réabsorbée à l'état normal au niveau du tube proximal par des cotransporteurs spécifiques localisés sur la membrane luminale. Le transport du glucose est couplé à celui du sodium. Le transport des acides aminés s'effectue par différents types de transporteurs en fonction du type d'acide aminé (neutres, diacides, dibasiques), couplés ou non au transport du sodium.

## 4. Réabsorption des phosphates

Les phosphates sont filtrés au niveau du glomérule et sont réabsorbés à 80 % au niveau proximal à l'aide d'un cotransporteur sodium-phosphate électroneutre ($2Na^+/HPO_4^{2-}$). Les phosphates échappant à la réabsorption proximale se retrouvent au niveau du tube distal sous forme de phosphates disodiques et représentent le principal système tampon évitant l'acidification de l'urine.

## 5. Réabsorption du calcium

70 % du calcium plasmatique est ultrafiltrable (calcium ionisé et calcium complexé à certains anions. La fraction non ultrafiltrable est liée aux protéines plasmatiques). Le tube proximal est le siège de 60 à 70 % de la réabsorption du calcium ultrafiltré, cette réabsorption étant étroitement liée à celle du sodium (la réduction de l'apport sodé réduit la calciurie). L'hormone parathyroïdienne n'a pas d'action au niveau proximal sur les mouvements du calcium.

## 6. Réabsorption de l'urée

La concentration plasmatique d'urée est fonction du taux de production (apports alimentaires protidiques) et du taux d'élimination rénale. L'urée est librement filtrée au niveau du glomérule et 60 % sont réabsorbés passivement au niveau du tube proximal. Le long du tube proximal, la concentration d'urée augmente, liée à la réabsorption du sodium et de l'eau. Nous verrons que l'urée participe dans les segments suivants au processus de concentration-dilution des urines.

## 7. Réabsorption de l'acide urique

L'acide urique est un acide faible, filtré au niveau glomérulaire à une concentration proche de celle du plasma. Chez l'homme, au niveau du tube proximal, l'acide urique est intensivement réabsorbé de manière active par un mécanisme non spécifique. Environ 90 % des urates filtrés sont réabsorbés. Il existe de plus un processus de sécrétion résultant d'une diffusion simple selon un gradient électrochimique d'urates.

À l'inverse de ces phénomènes de réabsorption, un certain nombre de composés, endogènes ou exogènes, peut être sécrété au niveau proximal. Il s'agit essentiellement d'anions et de cations organiques sécrétés soit par des systèmes de transporteurs spécifiques, soit par un système de diffusion non ionique, dépendant du pH de l'urine. Ceci est important, puisqu'un grand nombre de médicaments sont des acides ou des bases existant dans le plasma sous forme dissociée ou non dissociée. En modifiant le pH urinaire, on peut favoriser la sécrétion de certains composés permettant ainsi leur excrétion urinaire. Parmi les anions organiques, citons les céphalosporines, l'acide salicylique, le phénobarbital, etc. et pour les cations organiques, la quinine, la procaïne, la cimétidine, la morphine… Enfin, les cellules proximales synthétisent de l'ammoniac à partir de la glutamine d'origine hépatique. $NH_3$ est sécrété dans le fluide tubulaire par un mécanisme de diffusion non ionique et participe à la régulation de l'équilibre acido-basique (voir « *Rein et équilibre acide-base* »). Au total, à l'état normal, auront été réabsorbés au niveau proximal par rapport aux charges filtrées, 60 à 70 % de l'eau, du sodium et du potassium, 50 à 60 % du chlorure et de l'urée, 75 à 80 % du phosphate, 80 à 85 % des bicarbonates, et pratiquement 100 % du glucose et des acides aminés. À l'inverse, il y aura une sécrétion d'anions, de cations organiques et de $NH_3$.

Certains facteurs importants modulent la réabsorption proximale.

- *L'équilibre glomérulotubulaire* : le pourcentage de substances réabsorbées au niveau du tubule proximal reste relativement constant même en cas de variation du débit de filtration glomérulaire.

- *L'état volémique :* la perfusion de soluté salé ou l'expansion du volume extracellulaire diminuent la réabsorption au niveau du tubule proximal, la déplétion hydrosodée l'augmente.

D'autre part, un certain nombre d'hormones ou de médiateurs agissent au niveau du tube proximal en modulant la réabsorption de nombreuses substances (voir « *Hormones et fonctions rénales* »).

## B. Anse de Henlé

Le fluide tubulaire pénètre ensuite dans la branche descendante de l'anse de Henlé. À ce niveau, le fluide est encore iso-osmotique et le rein doit convertir un large volume de filtrat glomérulaire isotonique en un petit volume d'urines hypertoniques.

L'anse de Henlé, grâce à sa disposition anatomique en épingle à cheveux, joue un rôle fondamental dans le processus de concentration-dilution des urines. Le mécanisme en est le suivant :

- la branche descendante de l'anse de Henlé traverse un milieu qui devient de plus en plus hypertonique (gradient osmotique corticopapillaire), l'osmolalité du cortex à la médullaire allant respectivement de 300 à 1 200 mOsmoles/L. En traversant la médullaire hypertonique, le fluide tubulaire se concentre progressivement soit par addition de solutés, soit pas soustraction d'eau ;
- la branche ascendante est imperméable à l'eau. De ce fait, seuls sont réabsorbés le sodium et le chlorure de la lumière tubulaire vers le milieu interstitiel. Cette dissociation des transferts de sel et d'eau est à la base de la théorie de la multiplication à contre-courant permettant la concentration de l'urine. En effet, le sodium réabsorbé au niveau de la branche ascendante vers le tissu interstitiel est à l'origine de l'existence du gradient osmotique corticopapillaire permettant d'une part la concentration du sodium dans la branche descendante (entrée de sel et sortie d'eau) et d'autre part une dilution du fluide à la fin de la branche large ascendante (sortie de sel-imperméabilité à l'eau). La réabsorption du $Na^+$ au niveau de la branche large ascendante se fait de manière active à l'aide d'un cotransport luminal électroneutre ($Na^+/K^+/2Cl^-$) réabsorbant à la fois le sodium, le chlorure et le potassium. Le furosémide (Lasilix®), diurétique de l'anse, inhibe spécifiquement ce transporteur.

À l'entrée du tube distal, l'urine devient hypotonique (osmolalité d'environ 100 mOsm/L).

## C. Tube distal

Le tube distal redevient relativement perméable à l'eau et l'osmolalité du fluide tubulaire s'élève progressivement pour s'équilibrer avec celle du liquide interstitiel. Dans les conditions normales, l'urine est de nouveau iso-osmotique (300 mOsm/L) à la fin du tube distal. Les principales fonctions du tube distal sont la réabsorption du sodium et une sécrétion de potassium.

### 1. Réabsorption du sodium

La réabsorption du sodium s'effectue soit au travers de canaux sodiques inhibables par l'amiloride, soit par l'intermédiaire d'un cotransport couplant le passage du sodium et du chlorure, cotransport inhibé par le chlorothiazide. L'amiloride et les dérivés thiazidiques sont utilisés comme diurétiques en thérapeutique. La réabsorption importante de sodium à ce niveau génère un potentiel négatif dans la lumière tubulaire proportionnelle au flux de réabsorption sodé au tube distal. Cette réabsorption est proportionnelle à la charge de sodium délivrée. En effet, le tube distal est capable d'éponger toutes les modifications de la réabsorption ayant eu lieu en amont.

### 2. Sécrétion de potassium

Le tubule distal est le siège d'une sécrétion nette de potassium. Il n'y a pas d'échange direct entre un cation $Na^+$ et un cation $K^+$, la sécrétion de potassium étant favorisée par la différence de potentiel négative générée par la réabsorption de sodium. Il y a en revanche compétition entre la sécrétion de $K^+$ et de $H^+$, cette compétition étant en partie sous la dépendance de l'état acido-basique de l'organisme. Plusieurs facteurs influencent la sécrétion distale de potassium :

- *le régime alimentaire*. Un régime riche en potassium augmente la sécrétion de $K^+$, un régime pauvre l'inhibe ;
- *le débit du fluide tubulaire* : une augmentation du débit stimule la sécrétion de $K^+$ ;
- l'existence du potentiel négatif de la lumière tubulaire et son importance (donc fonction du taux de sodium réabsorbé) ;
- la disponibilité des ions $K^+$ et $H^+$, qui influencent réciproquement leur sécrétion. En cas d'acidose métabolique, il y a plus de $H^+$ sécrété, la sécrétion de $K^+$ est inhibée et l'inverse se produit en cas d'alcalose métabolique ;
- enfin, l'aldostérone, hormone minéralocorticoïde, possède des récepteurs au niveau du tubule distal. En favorisant la réabsorption de sodium, elle entraîne une sécrétion plus importante de potassium.

Les ions $H^+$ sécrétés au niveau tubulaire distal sont tamponnés par deux mécanismes pour éviter une baisse brutale du pH urinaire :

- les ions $H^+$ se combinent avec $NH_3$ sécrété par la cellule tubulaire, formant alors des ions $NH_4^+$ dont la rétrodiffusion est impossible ;
- la transformation des phosphates disodiques ($Na_2HPO_4$) en phosphates monosodiques ($NaH_2PO_4$) dans la lumière tubulaire (acidité titrable).

## D. Tube collecteur

Les principales fonctions des canaux collecteurs sont :

- la régulation fine des bilans de sodium et de potassium sous l'influence prépondérante de l'aldostérone. Les mécanismes de réabsorption de $Na^+$ et de sécrétion de $K^+$ sont identiques à ceux existant dans le tube distal ;
- la régulation du bilan de l'eau sous l'influence de l'hormone antidiurétique ADH ou arginine vasopressine AVP. C'est en effet au niveau du tubule collecteur que s'effectue véritablement le processus de concentration définitive des urines.

L'ADH augmente la perméabilité à l'eau de la membrane des cellules du tube collecteur. L'ADH permet de concentrer l'urine par la combinaison de trois actions principales sur les tubes collecteurs :

- elle augmente leur perméabilité à l'eau en agissant sur des aquaporines. Les aquaporines AQP sont des canaux hydriques de nature protéique traversant la membrane cellulaire. Il existe plusieurs types d'aquaporines distribuées dans l'organisme. Au niveau du rein, l'ADH agit essentiellement sur AQP 2, permettant ainsi la réabsorption osmotique d'eau lorsque ces canaux traversent les régions médullaires rénales dans lesquelles sont accumulés des solutés (principalement sodium et urée) en concentration très supérieure à celles du plasma ;
- elle agit sur la perméabilité à l'urée des cellules de la portion tout à fait terminale du tubule collecteur grâce à son action sur une protéine transporteuse d'urée (UT1A-1). À ce niveau, en présence d'ADH, l'urée peut diffuser vers le milieu interstitiel dont elle va augmenter la pression osmotique et donc la capacité de soustraire l'eau aux tubes collecteurs. L'urée de cette manière participe au maintien du gradient corticopapillaire nécessaire au processus de concentration des urines ;
- elle stimule la réabsorption du sodium dans la partie corticale des tubes collecteurs grâce à son action sur un canal sodium, ce qui permet de réabsorber plus d'eau à ce niveau (l'eau est entraînée par le sodium).

L'urine, iso-osmotique à l'entrée du tube collecteur, devient progressivement hyperosmotique le long du tube, du fait d'une réabsorption d'eau en excès par rapport à celle du sodium. L'urine atteint un équilibre osmotique avec l'osmolalité élevée au niveau de la papille. Il y a émission d'urine concentrée. À l'état normal, chez un sujet normalement hydraté et en présence d'ADH, l'urine définitive est hypertonique. À l'inverse, en absence d'ADH, le fluide tubulaire traverse le tubule collecteur sans subir de grandes modifications. Une urine diluée est émise.

Le processus de concentration urinaire est également modulé par le système échangeur à contre-courant des vasa recta (ne pas confondre avec le « système multiplicateur à contre-courant ») permettant le recyclage de l'eau et de l'urée et évitant ainsi la dissipation du gradient osmotique corticopapillaire. L'eau passe directement des vaisseaux descendants vers les vaisseaux ascendants plus concentrés et une partie des solutés remontant des régions profondes par les vaisseaux ascendants regagne les vaisseaux descendants moins concentrés. Une partie de l'urée libérée dans le milieu interstitiel remonte par les vaisseaux ascendants et rediffuse dans la branche descendante de l'anse de Henlé. Ce recyclage de l'eau, des solutés et de l'urée est nécessaire au maintien du gradient corticopapillaire et donc à l'émission d'urine concentrée (*fig.* 5).

En résumé, quatre facteurs sont indispensables à la concentration des urines :

- la disposition anatomique particulière des néphrons et des vaisseaux ;
- les propriétés particulières de perméabilité à l'eau, au sel et à l'urée des différents segments ;
- les transports actifs de sodium ;
- la présence d'hormone antidiurétique ADH.

Enfin, une autre fonction importante du tube collecteur est d'assurer à l'état normal l'acidification de l'urine nécessaire au maintien d'un équilibre acido-basique normal (voir chapitre ci-après).

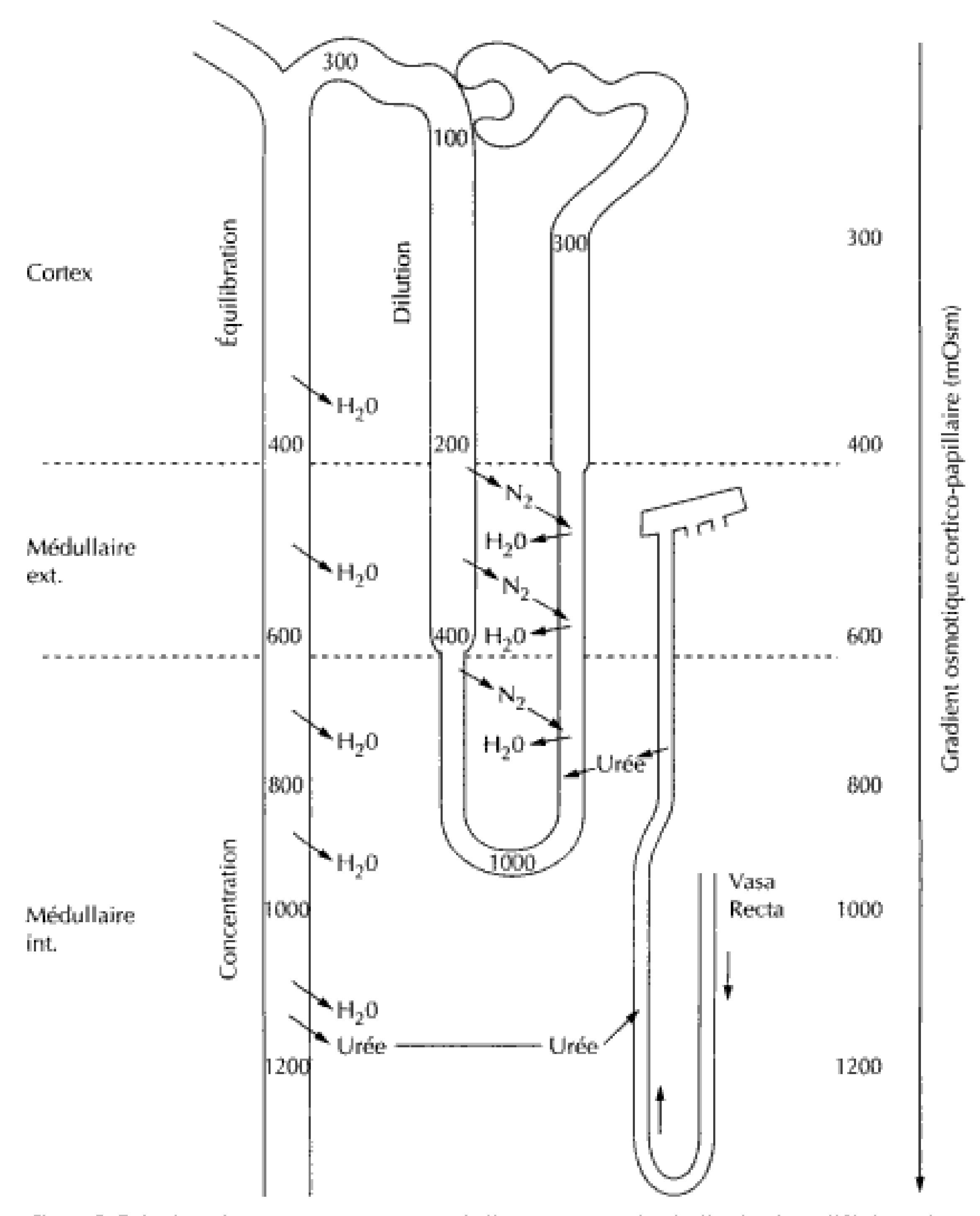



**Figure 5.** Principe du contre-courant multiplicateur et cycle de l'urée dans l'élaboration d'une urine hypertonique

## IV. Rein et équilibre acido-basique

Chez le sujet normal, le pH plasmatique est maintenu dans d'étroites limites (7,37 – 7,43) compatible avec un fonctionnement cellulaire normal. Quotidiennement, l'organisme est soumis à une charge acide d'origine métabolique d'environ 70 à 80 mmoles d'ions $H^+$ par 24 heures (métabolisme intermédiaire et alimentation). Le rein intervient de deux façons dans cette régulation : d'une part en réabsorbant tous les bicarbonates filtrés au niveau glomérulaire et d'autre part en

excrétant quotidiennement la charge acide sous forme d'acidité titrable et d'ammonium, régénérant ainsi tous les bicarbonates ayant servi à tamponner la charge acide. Le rein accomplit ces deux fonctions en sécrétant activement des ions $H^+$ dans la lumière tubulaire.

## A. Réabsorption des bicarbonates (*fig. 6*)

À l'état normal, la concentration de bicarbonates plasmatiques est stable et pour une alimentation protidique normale, il n'y a pas de bicarbonates dans les urines.

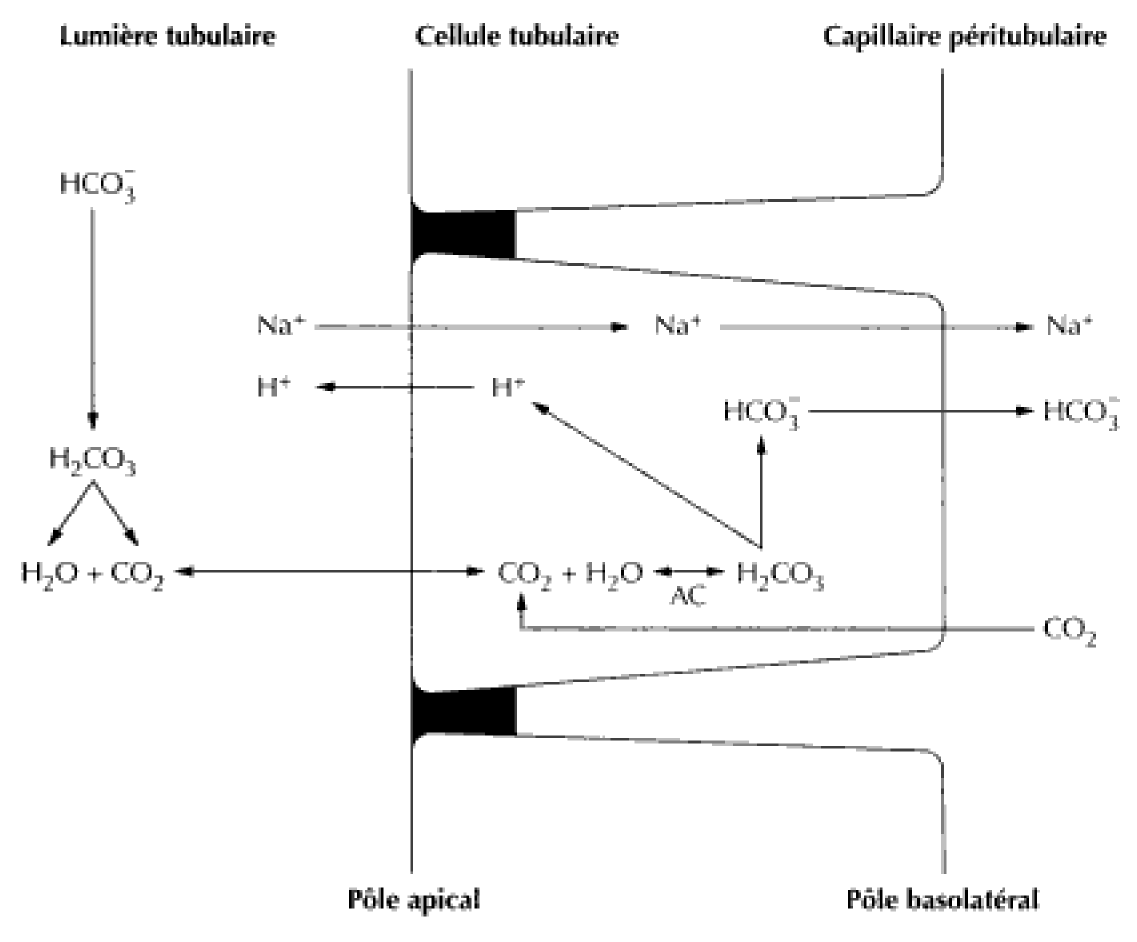



**Figure 6.** Réabsorption des bicarbonates

Le rein réabsorbe la totalité des bicarbonates filtrés, 85 % au niveau du tube proximal et 15 % au niveau de l'anse de Henlé et du tube collecteur. Cette réabsorption se passe de la manière suivante : l'ion  se combine à un ion $H^+$ dans la lumière tubulaire. Il se forme alors de l'acide carbonique ($H_2CO_3$) qui est instable et se décompose en eau et en gaz carbonique. L'eau reste stable dans le tube et sera éliminée. Le $CO_2$ diffuse dans la cellule tubulaire. Là, une enzyme spécifique localisée dans la membrane apicale, l'anhydrase carbonique, (AC), permet de reconstituer de l'acide carbonique à partir du $CO_2$ et d'une molécule d'eau. À partir de cet acide se forme un ion $H^+$ qui sera sécrété dans le tubule et un ion qui sera réabsorbé au niveau basolatéral dans le sang péritubulaire. Ce mécanisme permet donc la réabsorption des bicarbonates filtrés dont l'excrétion urinaire entraînerait une négativation du bilan des ions $H^+$.

Remarque : il est possible de bloquer l'enzyme par certains diurétiques. Les inhibiteurs de l'anhydrase carbonique (acétazolamide) augmentent l'excrétion urinaire des bicarbonates et du sodium, alcalinisent les urines et augmentent la diurèse.

## B. Régénération des bicarbonates par excrétion de l'acidité titrable (*fig. 7*)

Le pH du sang est très stable et varie dans des limites extrêmement étroites (7,40 ± 0,03). À l'opposé, le pH urinaire peut varier selon les besoins, de 4 (urines acides) à 8 (urines alcalines). Nous avons vu au niveau du tube distal et du tube collecteur que, pour éviter une acidification de l'urine, il existait des systèmes tampons, le principal étant le système tampon phosphate, captant les ions $H^+$ libres sécrétés dans la lumière tubulaire. Un ion $H^+$ formé dans la cellule tubulaire est échangé avec un ion $Na^+$ du phosphate disodique.

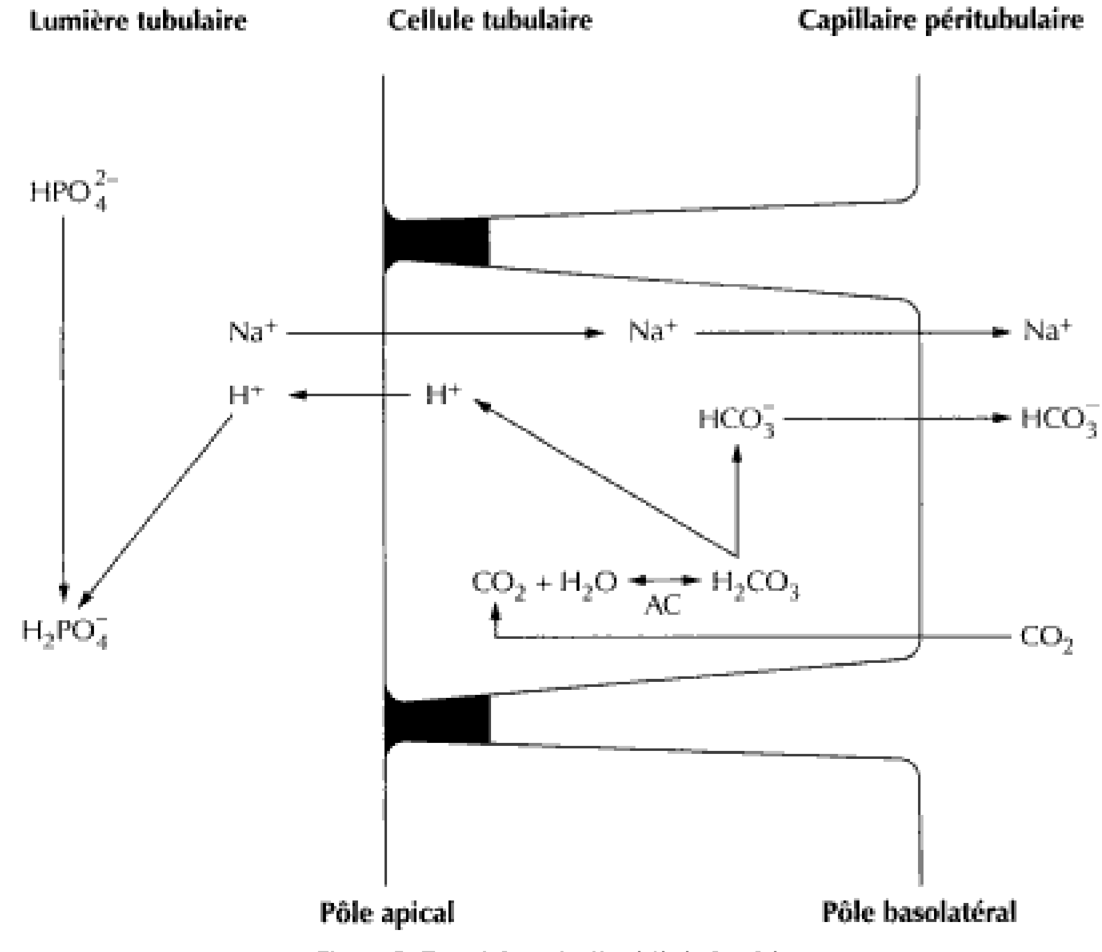



**Figure 7.** Excrétion de l'acidité titrable

Parallèlement à la formation de phosphate monosodique, il y a régénération d'un ion bicarbonate qui est ajouté au plasma et participe ainsi à la reconstitution du stock de bicarbonates… L'acidité titrable est la quantité d'ions $H^+$ sécrétée par le tubule qui titre les sels d'acides faibles urinaires. On parle d'acidité titrable puisque les ions $H^+$ ainsi captés ne participent plus à l'acidité libre urinaire, c'est-à-dire au pH des urines. Elle exprime la concentration d'équivalents acides. L'acidité titrable

est influencée d'une part par la teneur de l'urine en tampon phosphate monosodique et d'autre part le pH urinaire. L'excrétion d'acidité titrable augmente lorsque le pH urinaire diminue sous l'influence d'une augmentation de la sécrétion d'ions $H^+$ (acidose).

## C. Régénération des bicarbonates par excrétion d'ions ammonium *(fig. 8)*

La quantité de $NH_4^+$ filtré par le glomérule est négligeable et le $NH_4^+$ urinaire provient de l'ammoniogenèse dans les cellules tubulaires proximales qui possèdent des glutaminases capables de dégrader la glutamine d'origine hépatique. Le $NH_4^+$ produit peut être directement sécrété dans la lumière tubulaire ou dissocié à l'intérieur de la cellule en $NH_3$. Le $NH_3$ produit dans la cellule tubulaire est un gaz qui diffuse librement à travers la membrane et ceci d'autant plus facilement que le pH de l'urine est acide. L'ammoniac peut alors fixer un proton pour former l'ion ammonium $NH_4^+$. Parallèlement, un ion bicarbonate est régénéré à partir du métabolisme du cétoglutarate formé simultanément dans la cellule par désamination de la glutamine. Un sujet normal, soumis à un régime protéique normal est menacé par l'acidose puisque les protéines alimentaires et le métabolisme cellulaire produisent en permanence des ions $H^+$ (1 meq $H^+$/kg) que le rein doit éliminer pour que le pH sanguin soit maintenu dans la fourchette physiologique.

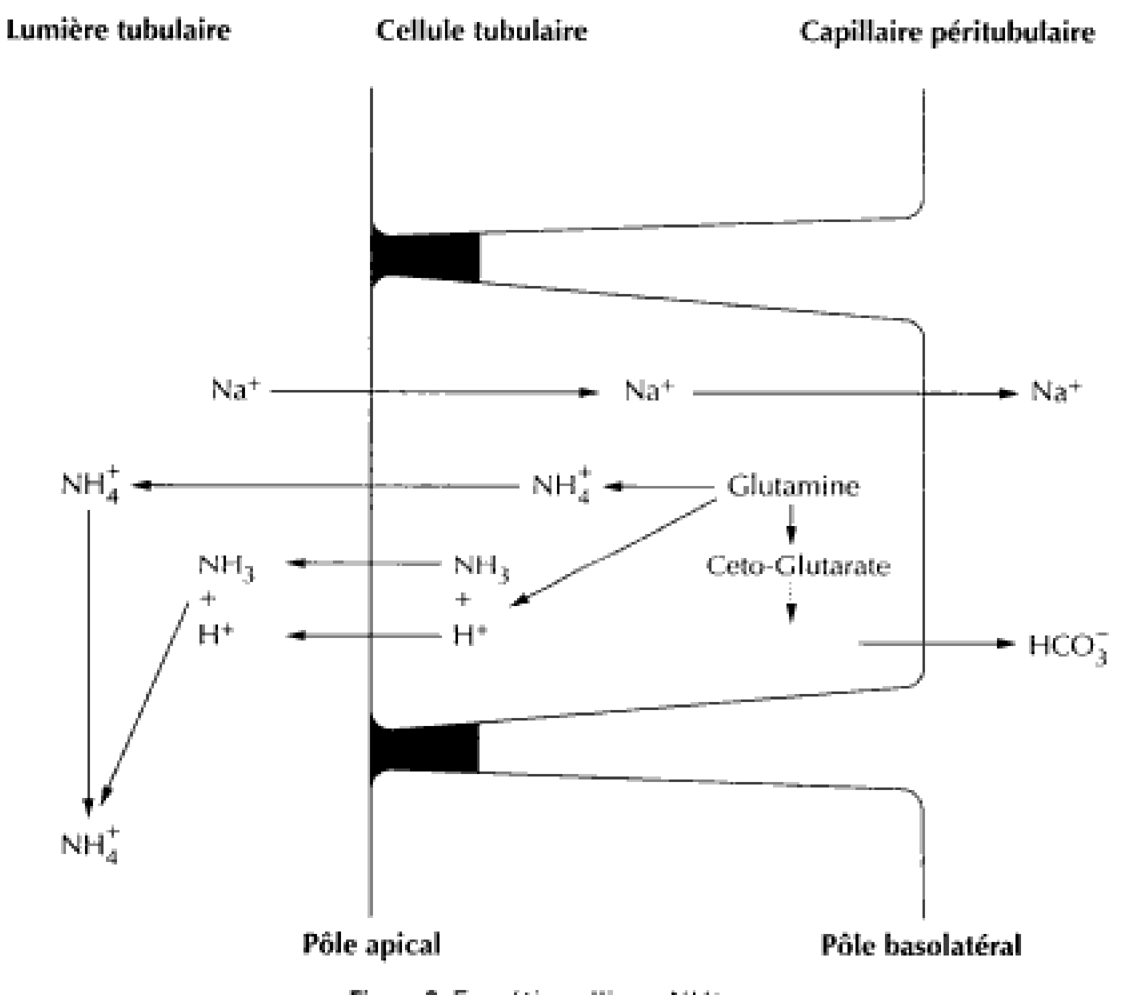



**Figure 8.** Excrétion d'ions $NH_4^+$

L'excrétion nette d'acides par le rein est égale à la somme de l'acidité titrable et de l'ammonium. À l'état normal, il n'y a pas de bicarbonates dans les urines et l'excrétion d'ions $H^+$ est effectuée pour deux tiers sous forme de $NH_4^+$ et pour un tiers sous forme d'acidité titrable.

# V. Fonctions endocrines du rein

À côté de ses fonctions excrétrices, le rein possède plusieurs fonctions endocrines participant soit directement à la régulation des grandes fonctions rénales, soit à la régulation d'autres fonctions de l'organisme (pression artérielle, érythropoïèse).

## A. Système rénine-angiotensine

Nous avons vu dans la structure du néphron que le tubule distal d'un néphron revenait au contact du pôle distal de son propre glomérule définissant une structure spécialisée appelée « appareil juxtaglomérulaire » (*fig. 1* et 2). Cette structure est située dans l'espace compris entre les artérioles efférente et afférente, le glomérule et le tube distal qui vient à son contact. L'appareil juxtaglomérulaire est formé de plusieurs types cellulaires :
- les cellules de la macula densa, dérivées des cellules tubulaires distales mais morphologiquement différentes ;
- des cellules myoépithélioïdes, dérivées des cellules musculaires lisses de l'artériole afférente ;
- de cellules se prolongeant dans le glomérule par les cellules mésangiales et occupant l'espace compris entre les deux artérioles, les cellules du lacis.

Les granules de sécrétion des cellules myoépithélioïdes de l'appareil juxtaglomérulaire renferment une enzyme libérée dans le courant sanguin, la rénine. Dans le sang, la rénine réagit avec un substrat d'origine hépatique, l'angiotensinogène ($\alpha 2$ globuline), pour donner l'angiotensine I, décapeptide dépourvu d'activité biologique. L'angiotensine I est ensuite transformée par une enzyme de conversion pour donner une octapeptide, l'angiotensine II, possédant plusieurs activités biologiques. L'angiotensine II est ensuite dégradée au niveau rénal par des angiotensinases, donnant des peptides inactifs (l'angiotensine III, heptapeptide, possède encore certaines propriétés biologiques, mais son activité est moindre comparée à celle de l'angiotensine II). L'enzyme de conversion transformant l'angiotensine I en angiotensine II est présente dans toutes les cellules endothéliales et épithéliales. L'angiotensine II agit sur ses organes cibles par l'intermédiaire de récepteurs membranaires. L'action cellulaire des récepteurs de l'angiotensine II est double : inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase par activation d'une protéine g inhibitrice et activation de la phospholipase C et de la production de phospho-inositol aboutissant à la mobilisation du $Ca^+$ libre intracellulaire. L'angiotensine II est l'une des substances endogènes les plus puissamment vasoconstrictrices à intervenir :
- dans la régulation de la pression artérielle, l'angiotensine II est hypertensive. Certaines hypertensions artérielles essentielles sont traitées par les inhibiteurs de l'enzyme de conversion empêchant la formation d'angiotensine II ou par des antagonistes des récepteurs à l'angiotensine ;

- au niveau rénal, l'angiotensine II, par son action vasoconstrictrice, diminue le débit sanguin rénal et, à un moindre degré, le débit de filtration glomérulaire. Au niveau du tubule proximal, elle favorise la réabsorption du sodium ;
- au niveau de la corticosurrénale, l'angiotensine II stimule la sécrétion d'aldostérone.

Par ces différentes actions, le système rénine-angiotensine II participe activement à la régulation du métabolisme hydrosodé et agit globalement sur le rein pour favoriser la réabsorption du sodium et de l'eau. Chez le sujet sain, l'ingestion de sel est le principal déterminant de la sécrétion de rénine. Un apport sodé élevé augmente le volume extracellulaire freinant la sécrétion de rénine et inversement. La sécrétion de rénine est également stimulée par plusieurs autres facteurs :

- la charge en sodium et en chlore délivrée par le fluide tubulaire au niveau de la macula densa. Toute augmentation de la concentration en NaCl est détectée au niveau de la macula densa, entraînant une sécrétion de rénine par les cellules épithélioïdes. L'angiotensine II produite diminue alors le débit de filtration glomérulaire ;
- toute chute de la pression artérielle stimule la production de rénine ;
- toute stimulation du système sympathique stimule la production de rénine. Les bêtabloquants freinent cette sécrétion ;
- enfin, il existe un rétrocontrôle négatif de la sécrétion de rénine par l'angiotensine II elle-même.

## B. Érythropoïétine

L'érythropoïétine (EPO) est une glycoprotéine synthétisée au niveau du rein par les cellules endothéliales des capillaires péritubulaires. Le principal stimulus de cette libération est l'hypoxie tissulaire dont le rein est l'un des organes cibles. L'érythropoïétine stimule l'érythropoïèse médullaire.

## C. Vitamine D

Le 25 hydroxycholécalciférol d'origine hépatique est hydroxylé au niveau rénal pour donner le 1,25 dihydroxycholécalciférol ou calcitriol, métabolite biologiquement actif de la vitamine D. L'enzyme responsable, la 1α-hydroxylase, est localisée au niveau des cellules tubulaires proximales, et la synthèse de calcitriol est liée aux besoins en calcium et phosphore de l'organisme.

## D. Autres

Le rein participe également à la synthèse et au métabolisme de différents agents vasoactifs, notamment les prostaglandines et la bradykinine, substances vasodilatatrices régulant le tonus vasculaire au niveau rénal.

# VI. Hormones et fonctions rénales

Outre ses fonctions endocrines, le rein est la cible de nombreux médiateurs neurohormonaux et la plupart des grandes fonctions rénales sont soumises à l'action et au contrôle d'un certain nombre de médiateurs et d'hormones, produits soit localement, soit au niveau d'autres organes.

## A. Système rénine-angiotensine

Il a déjà été largement décrit.

## B. Aldostérone

C'est un minéralocorticostéroïde sécrété par les cellules glomérulées du cortex surrénalien. L'aldostérone, comme toutes les hormones stéroïdes, se lie à un récepteur cytosolique de la cellule, et le complexe aldostérone-récepteur activé va se lier au noyau de la cellule. Après transcription et formation d'ARNm, il y a synthèse de protéines spécifiques capable d'activer le transport du sodium.
L'aldostérone agit sur les cellules tubulaires distales et les cellules du collecteur en favorisant la réabsorption de sodium contre l'excrétion du potassium. Elle augmente aussi la sécrétion d'$H^+$ qui se traduit par une augmentation de l'excrétion urinaire de $NH_4^+$. Les principaux stimuli de la sécrétion d'aldostérone sont l'hyponatrémie (*via* le système rénine-angiotensine) et l'hyperkaliémie. Inversement, la synthèse d'aldostérone diminue en cas d'hypernatrémie et d'hypokaliémie.
L'excès d'aldostérone (hyperaldostéronisme) aboutit à une hypertension artérielle (en rapport avec la rétention sodée) et à une hypokaliémie. Le défaut de synthèse aboutit à une perte en sel et à une hyperkaliémie.

## C. Hormone antidiurétique (ADH) ou arginine vasopressine (AVP)

L'hormone antidiurétique est une hormone polypeptidique synthétisée dans les noyaux supraoptiques et paraventriculaires de l'hypothalamus et sécrétée au niveau de la posthypophyse. Ce sont essentiellement les variations de la pression osmotique qui régulent la sécrétion et la concentration plasmatique d'ADH. Lorsque l'osmolalité plasmatique augmente, des osmorécepteurs hypothalamiques sont activés et il y a libération d'ADH. La sécrétion d'ADH est aussi stimulée par toute diminution du volume sanguin (hémorragies, pertes digestives, insuffisance cardiaque…) et met en jeu des barorécepteurs essentiellement carotidiens. Au plan rénal, l'ADH possède deux types de récepteurs membranaires :

- les récepteurs de type V1 couplés à la phospholipase C. Ces récepteurs, situés essentiellement au niveau du glomérule et des vasa recta, sont responsables des effets vasoconstricteurs de l'ADH ;
- les récepteurs de type V2 couplés à une protéine G, responsables de l'activation de l'adénylate cyclase et donc de la production d'AMPc, sont situés au niveau du tubule collecteur. L'interaction de l'ADH avec les récepteurs de type V2 conduit à l'inser-

tion membranaire liminale d'un canal à eau (AQP2) permettant de rapides mouvements d'eau suivant le gradient osmotique. L'eau est ensuite réabsorbée par la membrane basolatérale. Les défauts de ce mécanisme sont la cause du diabète insipide.

*Remarque* : dans le diabète insipide d'origine centrale, il n'y a pas de sécrétion d'ADH. Dans le diabète insipide d'origine néphrogénique, les récepteurs ne répondent pas à l'ADH.

### D. Facteur atrial natriurétique (ANF) ou peptide atrial natriurétique (ANP)

L'ANF est un peptide cyclique (28 AA) synthétisé au niveau des cellules myocardiques de l'oreillette droite principalement. Le stimulus majeur est une distension auriculaire générée par une augmentation de la volémie ou de la pression artérielle et qui stimule des volorécepteurs contenus dans leur paroi. C'est, principalement, au niveau du tubule collecteur médullaire que l'on trouve les récepteurs de l'ANF. Ces récepteurs sont couplés à la guanylate cyclase et l'interaction ANF-récepteurs entraîne la production de GMPc, second messager de l'ANF (la mesure de GMPc urinaire est d'ailleurs un bon reflet de l'activité de cette hormone). L'ANF inhibe la réabsorption de sel. Au plan rénal, l'ANF a un effet vasodilateur (augmentation du débit de filtration glomérulaire et de la fraction filtrée) et inhibe la sécrétion de rénine. Il diminue la sécrétion d'aldostérone. Sur le plan thérapeutique, on peut bloquer l'enzyme dégradant l'ANF (endopeptidase) et induire une importante natriurèse dans les états d'hypervolémie. L'urodilatine est un fragment de l'ANF ne comportant que 24 acides aminés et produite exclusivement dans le rein. Son effet natriurétique s'exprime à des concentrations plus faibles que l'ANF.

### E. Hormone parathyroïdienne (PTH)

La PTH est sécrétée par les glandes parathyroïdiennes en réponse à une hypocalcémie. Au plan rénal et, plus précisément, au niveau du tube proximal, la PTH, après interaction avec son récepteur, active l'adénylate-cyclase, conduisant à la formation d'AMPc. La PTH inhibe la réabsorption du sodium et des phosphates au niveau proximal (inhibition du cotransport $Na^+$-phosphate). Elle stimule la réabsorption du calcium au niveau du tube distal.

## L'essentiel de la question

Le rôle essentiel du rein est d'assurer l'homéostasie du milieu intérieur en participant à la régulation du volume et de la composition des liquides corporels par le contrôle de l'excrétion de l'eau, des électrolytes et des ions $H^+$, et en assurant l'élimination de certains déchets du métabolisme azoté comme l'urée et l'acide urique. Ce rôle d'excrétion, le rein ne peut l'effectuer qu'en raison de son architecture remarquable et en particulier à la disposition des unités fonctionnelles le composant, les néphrons et les rapports qu'ont ces derniers avec le réseau capillaire rénal. C'est

grâce à cet ensemble intégré que peuvent se réaliser les échanges entre l'urine primitive et le compartiment sanguin par des processus de réabsorption et de sécrétion. De même, cette disposition est à l'origine du système multiplicateur à contre-courant permettant le recyclage de l'eau et des solutés afin d'adapter le niveau de concentration ou de dilution des urines en fonction des besoins. Le tube urinifère réabsorbe environ 99 % du filtrat glomérulaire pour l'essentiel au niveau proximal. Le tube distal et le collecteur ajustent finement les bilans de sodium et d'eau sous l'influence de l'aldostérone et de l'hormone antidiurétique. Le tableau ci-dessous résume les fonctions essentielles des différents segments du néphron.

| Segments du néphron | Fonctions |
|---|---|
| Glomérule | Ultrafiltration : formation de l'urine primitive dépourvue de protéines |
| Tube proximal | Réabsorption iso-osmotique 70 % eau et Na<br>Réabsorption 90 % bicarbonates filtrés<br>Réabsorption 100 % glucose et ac. aminés<br>Réabsorption 70 % Ca, 60 % urée, 90 % ac. urique<br>Sécrétion anions et cations organiques<br>Ammoniogénèse |
| Anse de Henlé | Réabsorption 15 % Na (Na/K/2Cl)<br>Multiplication à contre-courant |
| Tube distal | Réabsorption Na et sécrétion K |
| Tube collecteur | Réabsorption Na et sécrétion K (aldostérone)<br>Régulation bilan de l'eau et urée (ADH) |

L'adaptation du rein à excréter l'eau et les solutés est remarquable, puisque ce n'est que pour une filtration glomérulaire diminuée de 70 à 80 % qu'apparaissent des troubles du métabolisme hydro-éléctrolytique.
En dehors de cette fonction primordiale d'excrétion, le rein participe également à l'équilibre acido-basique en permettant la réabsorption des bicarbonates filtrés (principal tampon plasmatique) et en excrétant la charge acide à laquelle est soumis quotidiennement l'organisme, permettant ainsi la régénération des bicarbonates plasmatiques.
Enfin, si le rein est la cible de nombreux médiateurs neuro-endocriniens, il possède également des fonctions endocrines participant à de nombreuses régulations. Parmi ces fonctions, la synthèse de la rénine à l'origine de l'angiotensine II, étroitement impliquée dans la régulation de la pression artérielle et la synthèse de l'érythropoïétine (EPO) qui stimule l'érythropïèse médullaire.

***Pour en savoir plus***


- Paillard M. *Physiologie rénale et désordres hydroélectrolytiques*. Paris, Hermann, 1992.
- Jaeger P. *Le métabolisme électrolytique et minéral*. Chênebourg, Suisse, Médecine et Hygiène, 1994.
- Offenstadt G., Brunette M.-G. « Réanimation », in *Désordres acido-basiques et hydroélectrolytiques*. Paris, A. Blackwell, 1997.

# Métabolisme phosphocalcique

M. DÉCHAUX, MCU-PH de physiologie, Hôpital Necker – Enfants malades, AP-HP, Paris.

*Le calcium est un cation essentiel au fonctionnement cellulaire. Il joue un rôle dans la fonction d'excitabilité des cellules musculaires dans la transmission du signal nerveux. Il est un régulateur de l'activité cellulaire et joue un rôle de deuxième messager pour la transmission de nombreux signaux hormonaux. Seul le calcium ionisé a cette activité de régulation. Dans l'os, le calcium est déposé sur la matrice protéique sous forme de cristaux amorphes d'hydroxyapatite et joue un rôle de soutien dans l'architecture du squelette. Le calcium des couches superficielles de l'os joue également un rôle de calcium rapidement mobilisable lors des besoins métaboliques. La régulation de la calcémie ionisée est très précise. Elle se fait à partir des flux calciques bidirectionnels de l'intestin, du rein et de l'os. Deux hormones principales règlent la calcémie et, de façon plus globale, la répartition du calcium dans l'organisme, os compris. Il s'agit de la PTH et du dérivé actif de la vitamine D, le calcitriol. L'action de la PTH est triple : au niveau rénal, elle augmente la synthèse du calcitriol dans le tube proximal et la réabsorption du calcium dans le tube distal. Par ailleurs, elle diminue la réabsorption de phosphate dans le tube proximal. Elle joue un rôle majeur dans le renouvellement osseux et le maintien d'une structure osseuse normale. La régulation de sa sécrétion se fait grâce au calcium sensing receptor dans la parathyroïde. Le calcitriol augmente l'absorption intestinale de calcium et de phosphate et joue un rôle majeur dans le métabolisme osseux. Des données récentes sur sa liaison à son récepteur cytoplasmique et/ou nucléaire, sur les mécanismes de régulation de son action périphérique via ses récepteurs activés sont actuellement disponibles. En particulier, le calcitriol régule la synthèse de protéines impliquées dans le transport du calcium dans l'entérocyte. Le phosphate est également un élément majeur du fonctionnement cellulaire. Sa concentration plasmatique est plus élevée chez l'enfant que chez l'adulte. La phosphatémie est réglée par le rein, mais elle dépend également de l'absorption intestinale et du niveau de remodelage osseux. L'identification récente des cotransporteurs phosphate-sodium aux niveaux rénal, intestinal et osseux est un progrès majeur. Grâce aux avancées récentes de la recherche en physiologie et en biologie moléculaire, la compréhension et l'identification des maladies congénitales du métabolisme du calcium et du phosphate progressent.*

# I. Calcium

Le calcium est un cation divalent de poids moléculaire 40 qui joue un rôle physiologique important. Dans le plasma, sa concentration molaire est de l'ordre de 2,5 mmol/L mais seul le calcium ionisé a une activité biologique. En intracellulaire, sa concentration est beaucoup plus faible (10-7 à 10-8 M) et à ces concentrations, sous forme ionisée également, il joue un rôle de régulation de l'activité de la cellule, deuxième messager pour certaines hormones, régulation de l'excitabilité cellulaire pour d'autres. Dans l'os, son rôle est très particulier, rôle de maintien mécanique et rôle de réserve de calcium rapidement mobilisable.

## A. Répartition du calcium dans l'organisme

Le calcium est réparti de façon inégale dans les différents compartiments de l'organisme.

### 1. Dans les liquides extracellulaires (LEC)

Il représente 0,1 % du calcium total de l'organisme. *Dans le plasma,* la concentration physiologique du calcium est normalement comprise entre 2,25 et 2,65 mmol/L. À noter que les concentrations de calcium chez le nourrisson sont souvent plus élevées, pouvant atteindre 2,75 à 2,80 mmol/L. Chez un individu donné, la calcémie varie très peu, moins de 5 % autour de sa valeur d'équilibre. La calcémie totale (Cat) comprend le calcium lié aux protéines, essentiellement à l'albumine (environ 45 % du Cat), le calcium libre (non lié) et ionisé (environ 50 %) et le calcium libre mais non ionisé car complexé à des anions de type phosphate, citrate et bicarbonate (environ 5 %). *Seul le calcium ionisé est biologiquement actif.* La calcémie totale varie avec la concentration de protéines plasmatiques. De ce fait, toute augmentation de l'albuminémie, de la protidémie en pratique courante, entraîne une augmentation de la calcémie totale. Cette situation biologique peut être observée lors d'une déshydratation touchant le secteur extracellulaire. Inversement, une baisse de l'albuminémie telle qu'on peut la rencontrer dans un syndrome néphrotique entraîne une baisse de la calcémie totale sans modifier pour autant la calcémie ionisée. Cette liaison du calcium à l'albumine dépend du pH sanguin : toute acidose diminue l'affinité de la liaison Ca-albumine et augmente donc, à calcémie totale constante, la calcémie ionisée. Un abaissement de 0,1 unité pH entraîne une augmentation d'environ 0,05 mmol/L de calcium ionisé. Inversement, une alcalose accroît l'affinité de la liaison calcium-albumine et réduit donc, à calcémie totale identique, la calcémie ionisée. *Dans les liquides interstitiels*, la concentration de calcium est en équilibre avec la concentration de calcium diffusible du plasma, soit la somme Ca ionisé et calcium complexé. Elle est de l'ordre de 1,4 mmol/L.

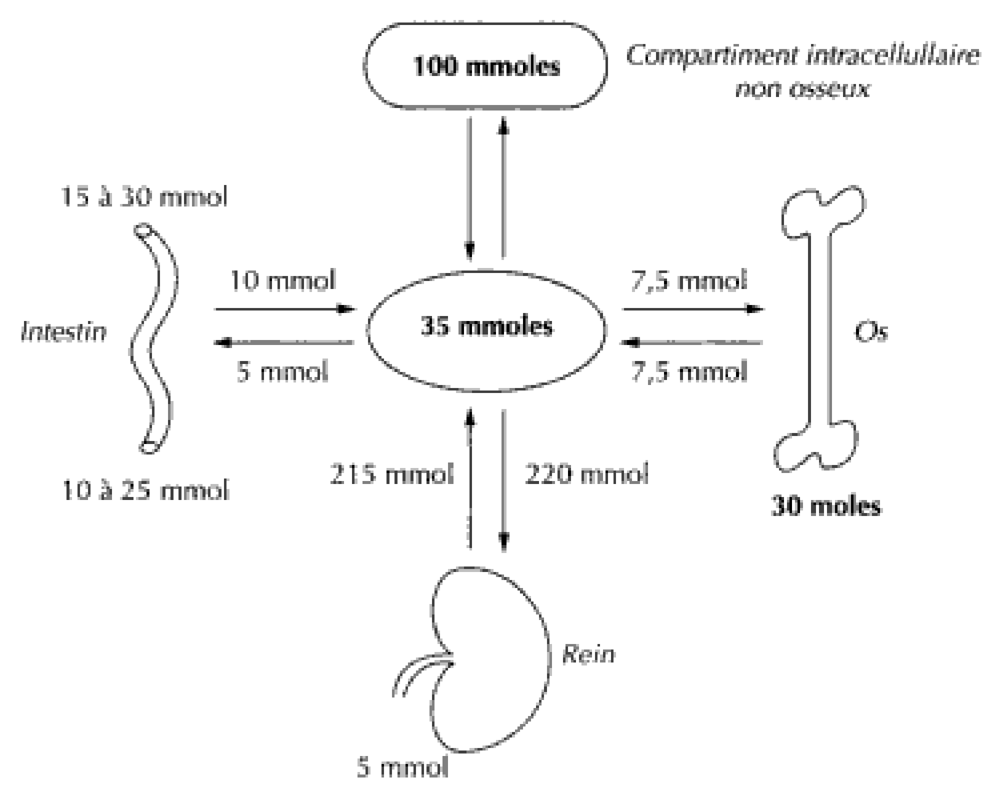
### 2. Dans le liquide intracellulaire

Le stock de calcium représente environ 100 mmol contre 35 mmol pour le secteur extracellulaire. Ce calcium est essentiellement sous forme liée à l'intérieur des organites cellulaires, entre autres mitochondries et réticulum endoplasmique, d'où il peut être libéré sous l'action d'un signal et déclencher une cascade de réactions. En situation basale, la concentration du calcium intracellulaire, $[Ca^{++}]_i$ sous forme libre, est de l'ordre de $10^{-8}$ M.

### 3. Dans l'os

Le calcium est très abondant. Il représente environ 30 moles, soit 1,200 kg. Ce calcium est réparti dans deux compartiments, le compartiment d'os profond et le compartiment dit de « calcium rapidement échangeable », représentant environ 100 mmoles. Ce dernier joue un rôle crucial dans la régulation de la calcémie. Les échanges bidirectionnels entre ce compartiment et le liquide extracellulaire sont

estimés (*fig. 1*) à 7,5 mmol/jour. Cela signifie qu'il existe des échanges constants entre l'os et le compartiment extracellulaire et que les phénomènes de résorption osseuse et d'accrétion osseuse sont normalement équilibrés. Dans l'os, le calcium se présente sous forme de cristaux d'hydroxyapatite, sels complexes de calcium, phosphate et magnésium pour 85 %, et sous forme de carbonate de calcium pour 15 %. La phase organique de la matrice osseuse est composée pour 90 % de collagène de type I. Les autres protéines sont essentiellement l'ostéocalcine, la phosphatase alcaline, l'ostéopontine, etc.




Le calcium est partiellement absorbé. À l'état d'équilibre, la sortie rénale de calcium est égale à environ 3 à 5 mmoles/jour. Les flux de calcium entrant et sortant de l'os sont égaux.

**Figure 1.** Bilan du calcium

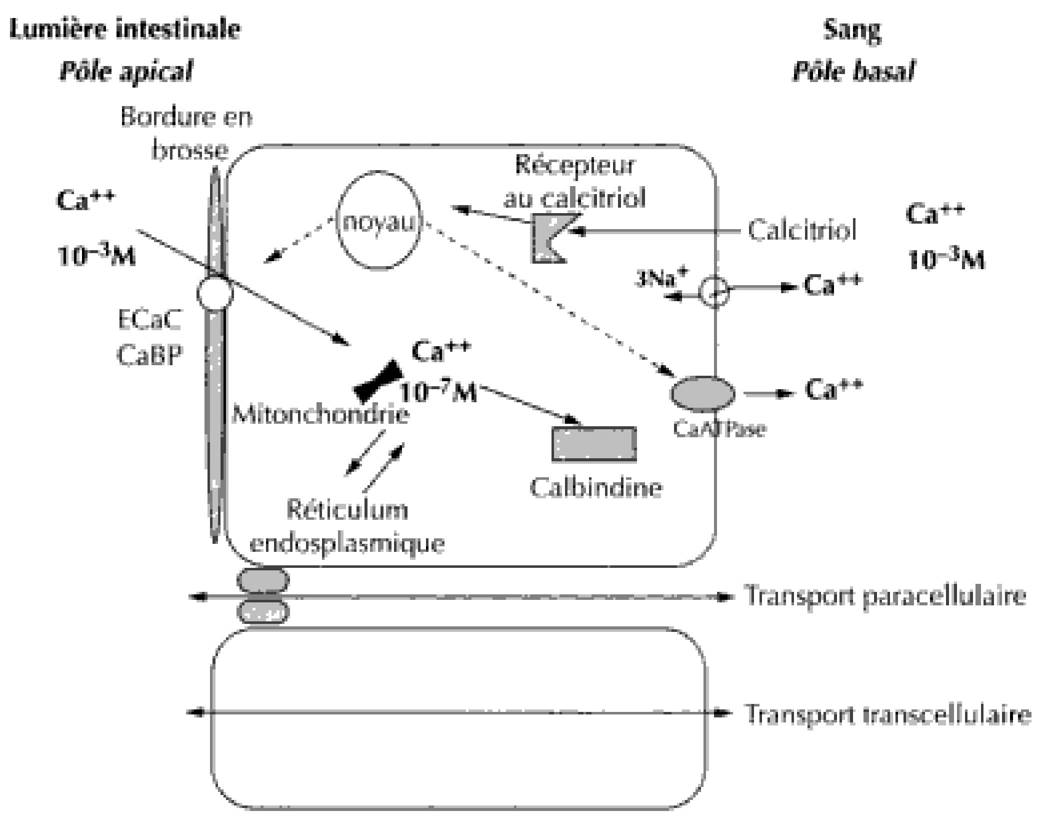
## B. Homéostasie calcique

Le maintien d'une calcémie normale dépend des flux de calcium dans l'intestin, le rein et l'os. Dans une première partie, le rôle de ces organes dans le bilan du calcium sera exposé. Dans une deuxième partie, le rôle des hormones dans la régulation de la calcémie, la parathormone (PTH) et le dérivé actif de la vitamine D, le 1,25-$(OH)_2D_3$ ou calcitriol, sera décrit.

### 1. Absorption intestinale

L'absorption nette journalière de calcium (150 à 200 mg/jour) est nécessaire au maintien d'un capital calcique normal et, en particulier, à la stabilité du contenu calcique osseux. En effet, à jeun, la calcémie est maintenue constante car le flux de calcium sortant de l'os compense les sorties rénales obligatoires de calcium. Lorsque les apports alimentaires ou l'absorption intestinale sont défectueux, il se pro-

duit une perte minérale osseuse. En conséquence, à l'état d'équilibre chez un sujet normal, la calciurie des 24 heures reflète l'absorption nette digestive.
L'absorption nette de calcium est la résultante du flux d'absorption du calcium par la muqueuse intestinale et du flux sortant de calcium éliminé dans les sécrétions digestives. Deux mécanismes sont impliqués dans l'absorption du $Ca^{++}$ : un mécanisme actif saturable et un mécanisme passif. L'absorption intestinale passive se fait tout au long du tube digestif par une voie paracellulaire. La force de conduction est le gradient électrochimique de part et d'autre de la muqueuse intestinale. L'absorption active, par transport transcellulaire, se fait principalement dans le duodénum. L'entrée du calcium dans l'entérocyte se fait selon le gradient de concentration et pourrait faire intervenir un canal calcique (ECaC pour *epithelial calcium channel*), une *calcium-binding protein* (CaBP) au pôle apical permettant au calcium sa translocation au pôle basolatéral de la cellule, et une calcium ATPase ainsi qu'un échangeur $Ca^{++}/Na^{+}$ au pôle basolatéral (*fig.* 2). L'absorption intestinale est régulée par le calcitriol qui module les quantités de protéines nécessaires :
- à l'entrée du calcium au pôle apical ;
- à sa traversée cytoplasmique sous forme liée ;
- à son extrusion au pôle basolatéral.




Le calcitriol se fixe à son récepteur cytosolique et induit la synthèse de protéines qui permettent le transport apical, la translocation et l'extrusion basolatérale du calcium de la cellule.

**Figure 2.** Absorption intestinale transépithéliale du calcium

De plus, l'absorption intestinale du calcium augmente lorsque :
- la quantité de calcium alimentaire augmente ;
- la forme physicochimique du sel de calcium permet au calcium d'être sous forme soluble, ionisée (inversement les sels non dissociés sont peu absorbables) ;

- le pH gastrique est très acide, ce qui facilite la dissociation et donc l'absorption du calcium ;
- la quantité de phosphates du régime est faible,
- le contenu en lactose, fructose, en NaCl est élevé.

Inversement, un contenu alimentaire riche en fibres, en phosphates, en graisses, en alcool, en oxalates, toutes circonstances dans lesquelles le calcium est chélaté, diminuent l'absorption du calcium. D'autres hormones que le calcitriol peuvent augmenter directement ou non l'absorption intestinale de calcium :

- l'IGF-I ;
- la prolactine ;
- les œstrogènes ;
- les hormones thyroïdiennes.

Des circonstances physiologiques pendant lesquelles les besoins en calcium sont accrus s'accompagnent également d'une augmentation de l'absorption du calcium :

- la croissance ;
- la grossesse ;
- la lactation.

Les apports recommandés durant ces différentes périodes de vie sont regroupés dans le *tableau 1*. Dans des circonstances pathologiques, l'absorption intestinale de calcium peut être diminuée. On peut citer :

- l'excès endogène ou exogène de glucocorticoïdes ;
- la malabsorption digestive ;
- l'insuffisance rénale (défaut de synthèse rénale de calcitriol) ;
- l'hypoparathyroïdie ;
- l'âge avancé ;
- l'ostéoporose…

**Tableau 1.** Apports recommandés en calcium*

| | **mg/jour** |
|---|---|
| **Nourrissons** | |
| 0-6 mois | 400 |
| 6 mois-1 an | 600 |
| **Enfants** | |
| 1 à 9 ans | 800 |
| préadolescents | 1 200 |
| puberté - adolescents | 1 200-1 500 |
| **Adultes** | |
| femmes 20 à 50 ans | 1 000 |
| femmes > 55 ans | |
| avec œstrogénothérapie | 1 000 |
| sans œstrogénothérapie | 1 500 |
| hommes < 65 ans | 800 |
| hommes > 65 ans | 1 000-1 500 |
| femme enceinte ou allaitante | 1 000 |

* Conférence de consensus de l'Institut national de la santé, États-Unis, 1994.

## 2. Rein et calcium

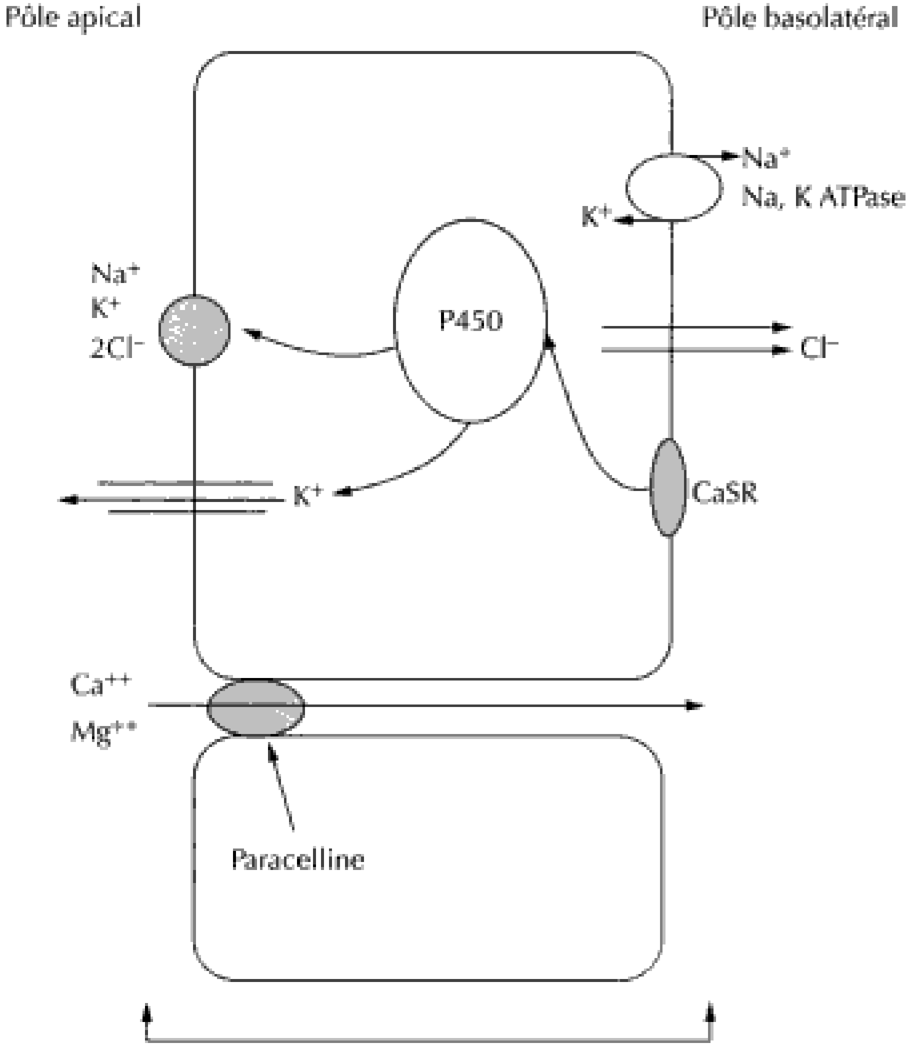
### a) Physiologie

Le calcium libre, non lié aux protéines, est filtré dans le glomérule. Il est ensuite massivement réabsorbé tout au long du tubule puisque environ 98 % du calcium filtré est réabsorbé dans les différentes parties du néphron : la majeure partie du calcium filtré, 60 %, est réabsorbée dans le tube proximal (TP), tube contourné proximal où la réabsorption est passive, couplée à celle du sodium, au niveau des jonctions intercellulaires. Dans le segment $S_3$ du TP, la réabsorption est active et se produit contre un gradient électrochimique. (Le rôle d'un canal chlore particulier, CLC5, est encore mal compris. Il est cependant établi qu'une anomalie dans le gène codant pour cette protéine entraîne un syndrome proximal, syndrome de Dent, où l'hypercalciurie est prédominante.) Toute modulation de la réabsorption de sodium dans le TP entraîne des modifications de même sens de la réabsorption calcique. Le calcium ayant échappé à la réabsorption proximale est ensuite réabsorbé dans l'anse ascendante large de Henlé (20 %). Cette réabsorption se fait également par une voie paracellulaire *via* une liaison à une protéine spécifique, la paracelline. Le moteur de cette réabsorption paracellulaire est le gradient électrochimique transépithélial. Tout défaut de réabsorption transépithéliale de Na, K, Cl dans ce segment entraîne une anomalie de réabsorption calcique par voie paracellulaire. C'est ainsi qu'on explique l'hypercalciurie induite par le furosémide ou observée dans le syndrome de Bartter. De plus, l'activité de la branche ascendante de Henlé est modulée par le récepteur sensible au calcium (CaSR). Toute augmentation de la liaison du $Ca^{++}$ au CaSR entraîne une diminution des réabsorptions dans l'anse de Henlé et donc une diminution du gradient électrochimique transépithélial. Inversement, toute diminution de l'activité de ce système entraîne une augmentation des réabsorptions de Na, K, Cl et donc de calcium (*fig. 3*). Dans la partie distale du néphron, la réabsorption du calcium (15 % de la charge filtrée) est, au moins partiellement, active. Elle est modulée par les hormones calciotropes, 1,25-$(OH)_2D_3$, PTH et calcitonine. Dans ces segments distaux, l'entrée du calcium au pôle apical se fait grâce à des canaux calciques (ECaC pour *epithelial Ca channel*). Dans la cellule, le calcium se fixe à des protéines de type calbindine (deux formes de calbindine sont décrites dans ce site, D-28k et D-9k), et le calcium est extrudé de la cellule par différents systèmes, Ca-ATPases, $Na^+/Ca^{++}$ contre-transporteur, etc. Dans le collecteur distal, environ 5 % du calcium filtré est réabsorbé. Le CaSR inséré au pôle apical de la cellule module la réabsorption d'eau AVP-dépendante, augmentant la diurèse lors de situations d'hypercalcémie accompagnées d'hypercalciurie. De plus, l'AVP peut stimuler la réabsorption de calcium dans le collecteur distal.

### b) Régulation physiologique de la calciurie

La calciurie est dépendante de nombreux facteurs :

- hyper- et hypocalcémie : de façon générale, la calciurie dépend de la *calcémie*. Pour une calcémie ionisée inférieure à 1,20 mmol/L, la calciurie est très basse, voire nulle. Au-delà de cette concentration, la calciurie augmente avec la calcémie. La relation calcémie-calciurie est réglée par le CaSR rénal : toute hypercal-




Le CaSR situé au pôle basolatéral de la cellule se fixe à son récepteur membranaire (grisé) et induit une modulation des réabsorptions de Na, K et chlore. De ce fait, la ddp transépithéliale, générée par ce transport multi-ionique, est plus ou moins importante. Le calcium réabsorbé en paracellulaire dépend de cette ddp. Indirectement donc, le CaSR module la réabsorption de calcium dans ce site.

**Figure 3.** Réabsorption du calcium dans la branche ascendante de Henlé

ciurie associée à une hypocalcémie ou toute hypocalciurie avec hypercalcémie fait évoquer une anomalie du CaSR ;

- il existe une relation *calciurie et volume extracellulaire* : l'expansion des LEC entraîne une inhibition des réabsorptions proximales et donc indirectement une diminution de la calciurie. L'inverse est vrai et une part de l'action hypocalciuriante des thiazidiques est expliquée par une diminution des LEC ;
- *PTH et PTHrp* : la PTH augmente la réabsorption du calcium et diminue donc la calciurie en augmentant l'entrée cellulaire du calcium au niveau du tube distal ;
- *vitamine D* : les effets directs des dérivés actifs de la vitamine D sur la réabsorption tubulaire du calcium sont encore controversés mais une sécrétion accrue de $1,25\text{-}(OH)_2D_3$ induit une augmentation de l'absorption intestinale du calcium,

une tendance hypercalcémique ou une hypercalcémie vraie et donc, indirectement au moins, une hypercalciurie ;

- *calcitonine* : ses effets sont encore peu clairs. Elle semble induire une hypercalciurie en utilisation aiguë à doses pharmacologiques ;
- *hormones gluco- et minéralocorticoïdes* : un excès de glucocorticoïdes endogènes ou exogènes entraîne une hypercalciurie. Cette action est liée à une résorption osseuse accrue mais aussi à une action tubulaire. Les minéralocorticoïdes agissent probablement par un double mécanisme, action directe tubulaire au niveau distal mais également action d'expansion des liquides extracellulaires et donc diminution des réabsorptions proximales de sodium et de calcium ;
- *autres hormones* : certaines hormones comme le glucagon, l'insuline ou les hormones thyroïdiennes, ont une action rénale directe sur l'excrétion du calcium, probablement dans la branche ascendante large de Henlé. L'hyperthyroïdie entraîne une hypercalciurie alors que l'hypothyroïdie s'accompagne d'hypocalciurie ;
- *état acido-basique* : l'acidose métabolique, quelle qu'en soit la cause, s'accompagne d'hypercalciurie par augmentation de la fraction ionisée du calcium sanguin et donc par augmentation de la charge filtrée de calcium. L'autre mécanisme évoqué est la diminution de la réabsorption distale du calcium, PTH dépendante ou non ;
- *influence des phosphates et du magnésium* : la déplétion en phosphates entraîne une hypercalciurie alors qu'une hyperphosphatémie entraîne l'effet inverse. Le magnésium entraîne des effets complexes directs et indirects *via* la PTH. La perfusion de Mg induit une hypercalciurie par freination de la PTH et une diminution directe de la réabsorption du calcium probablement au niveau du tube proximal. En revanche, l'hypomagnésémie chronique sidère la sécrétion de PTH ;
- *facteurs alimentaires* : des apports alimentaires excessifs de calcium mais aussi de sodium, de protéines animales d'origine non laitière, de sucre raffiné peuvent induire ou aggraver une hypercalciurie. Les sujets lithiasiques semblent particulièrement sensibles à ces derniers mécanismes et une amplification de l'hypercalciurie peut ainsi être observée chez eux ;
- *activité physique* : l'immobilisation prolongée augmente la calciurie alors que l'activité physique favorise l'accrétion osseuse ;
- *facteurs médicamenteux* : des agents pharmacologiques peuvent modifier la calciurie. Le furosémide (inhibiteur du cotransporteur $Na^+$, $K^+$, $2Cl^-$) ainsi que le bumétamine et l'acide éthacrinique inhibent la réabsorption dans la branche ascendante de Henlé et ont donc une action hypercalciuriante. Les diurétiques thiazidiques (inhibiteurs du cotransporteur $Na^+$-$Cl^-$ au pôle apical de la cellule) diminuent le volume extracellulaire et stimulent ainsi la réabsorption proximale conjointe du sodium et du calcium. Ils stimulent également directement la réabsorption distale du calcium. Le mécanisme invoqué est une augmentation de l'entrée apicale du calcium *via* ECaC et une augmentation des échanges $Na^+/Ca^{++}$ au pôle basolatéral de la cellule, conséquence de la diminution de l'entrée de NaCl dans la cellule.

## 3. PTH et métabolisme calcique

### a) Métabolisme de la PTH

La PTH est une hormone polypeptidique composée d'une seule chaîne de 84 acides aminés. Chez l'homme, le gène, situé sur le bras court du chromosome 11, code pour un peptide de 115 acides aminés, la préproPTH, rapidement clivée en un peptide de 90 acides aminés, la proPTH, et enfin en PTH qui est la molécule stockée dans la cellule sous forme de granules et sécrétée. La PTH circule au moins sous deux formes :
- l'hormone intacte (1-84), dont le poids moléculaire est de 9 300. Ce fragment est biologiquement actif, a une demi-vie brève, de l'ordre de 5 à 10 minutes, et représente environ 10 % de la PTH immunoréactive circulante ;
- des fragments de formule carboxy-terminale biologiquement inerte et de demi-vie longue. Ces derniers fragments s'accumulent en insuffisance rénale et peuvent « parasiter » des dosages peu spécifiques.

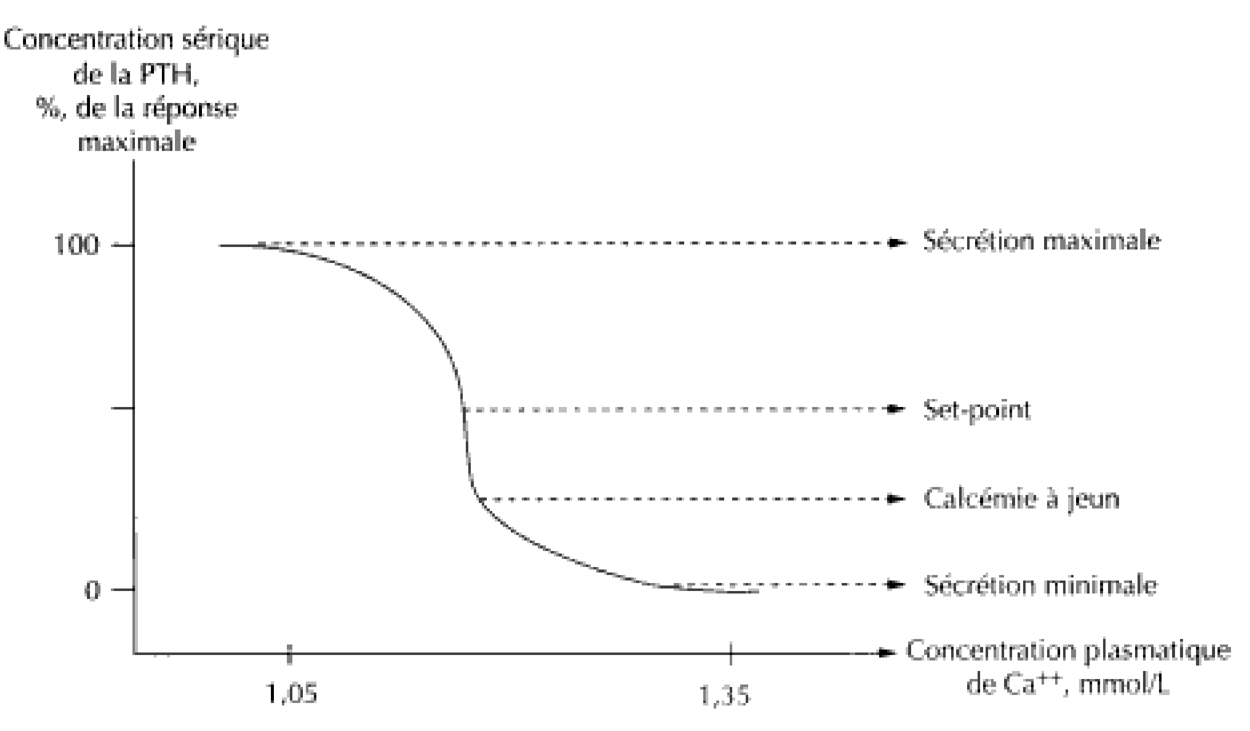
D'autres fragments ont été identifiés récemment et interfèrent dans les dosages plasmatiques dits de « PTH intacte », en particulier un fragment 7-84, d'origine parathyroïdienne, dont l'activité biologique est opposée à celle de la molécule intacte :
- action hypocalcémiante ;
- peu ou pas d'action phosphaturiante ;
- le deuxième messager n'est pas l'AMPc, contrairement à la PTH 1-84.

Ce fragment se lie sur le même récepteur que le 1-84 mais n'induit pas d'induction des actions de la PTH. Il s'y oppose même, en entraînant une internalisation de ce récepteur. L'effet osseux est également opposé à celui de la PTH 1-84 : effet inhibiteur sur la résorption osseuse et sur le remodelage osseux. La régulation de la sécrétion normale de ces deux formes de parathormone est encore mal élucidée. Il est certain que les sujets souffrant d'une hyperparathyroïdie secondaire, comme dans l'insuffisance rénale chronique chez l'hémodialysé, ont des sécrétions plus importantes du fragment 1-84 que le sujet normal. Cela complique la compréhension de ces situations et la compréhension des résultats des dosages de la PTH. Ce point sera évoqué plus complètement dans le chapitre intitulé « L'exploration du métabolisme phospho-calcique et du métabolisme osseux »..

### b) Régulation de la sécrétion de PTH

#### ▪ *Par la calcémie ionisée*

Une baisse de la calcémie entraîne une augmentation de la PTH circulante et, inversement, toute augmentation de la calcémie ionisée freine la sécrétion et la libération de PTH. Il existe une relation sigmoïde inverse entre la concentration plasmatique de calcium et celle de PTH (*fig. 4*). Le mécanisme de cette régulation est maintenant bien établi : la calcémie ionisée par l'intermédiaire du *calcium sensing receptor* (CaSR) régule la sécrétion de PTH. Le *CaSR* est une protéine transmembranaire appartenant à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G dont le gène se trouve sur le chromosome 3 :
- il reconnaît comme ligand naturel les cations polyvalents, principalement le calcium ;
- il a une moindre affinité pour le magnésium ;
- le gadolinium a également une grande affinité pour cette protéine et c'est le ligand utilisé expérimentalement pour stimuler le CaSR.




Elle dépend de la calcémie ionisée. 50 % de la réponse maximale de la PTH se fait pour une calcémie située dans la zone physiologique. Cette concentration est de l'ordre de 1,20 mmol/L (*set point* des Anglo-saxons).

**Figure 4.** Réponse sécrétoire de la PTH

Dans la parathyroïde, l'augmentation de la concentration du ligand active le récepteur et les protéines G couplées et provoque une augmentation des inositols phosphates intracellulaires, du diacylglycérol et du calcium libre cytosolique (*fig. 5*). En parallèle, l'activation du CaSR entraîne une diminution de la libération intracellulaire d'AMPc. L'effet biologique médié par ces seconds messagers est une diminution de la sécrétion de PTH. Inversement, une diminution de la concentration du ligand, le calcium ionisé, inactive le récepteur et entraîne une augmentation de la sécrétion de PTH. Le CaSR se retrouve non seulement dans les cellules

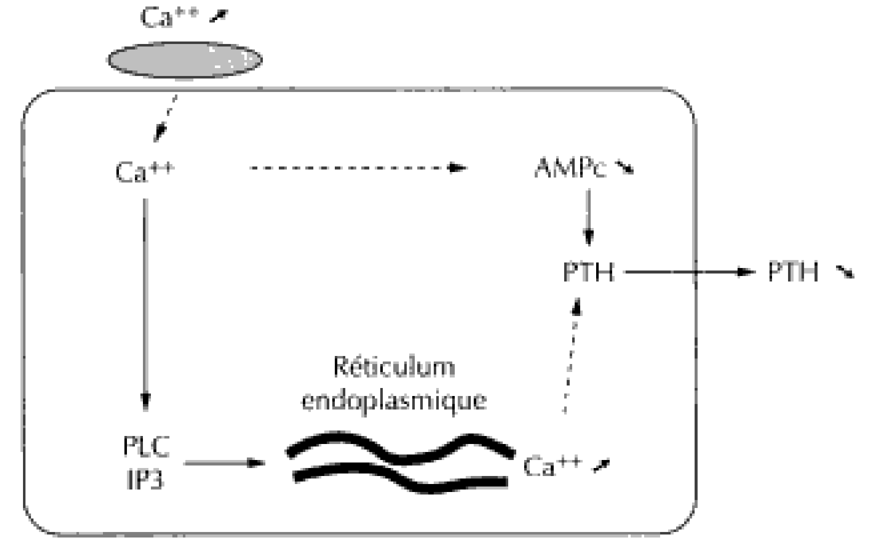



**Figure 5.** Dans la glande parathyroïde, une augmentation de la calcémie ionisée entraîne une activation du *calcium sensing receptor* membranaire (grisé) et une cascade de réactions menant à une diminution de la libération de PTH

parathyroïdiennes où il a été initialement décrit mais encore dans d'autres organes impliqués dans la régulation du calcium comme l'intestin, le rein, les cellules C de la thyroïde. Des transcrits ont également été trouvés dans d'autres sites moins classiquement liés au métabolisme calcique comme le cerveau, les bulbes olfactifs, les plexus mésentériques, les cellules cryptiques du côlon, les cellules G de l'antre gastrique, les cellules épithéliales du cristallin. Le rôle du CaSR dans ces différents organes est encore à l'étude. On peut simplement noter la fréquence des cataractes associées à des anomalies calciques.

#### ■ *Par le 1,25-$(OH)_2D_3$*

Il agit *via* sa liaison à son récepteur nucléaire spécifique, pour le récepteur à la vitamine D (VDR) exprimé dans la parathyroïde. Le calcitriol diminue la synthèse du mRNA de la PTH et inhibe la prolifération des cellules parathyroïdiennes. De plus, il pourrait augmenter l'expression du CaSR, contrairement au calcium lui-même, ce qui indirectement induit une freination de la sécrétion de PTH. De ce fait, l'hyperplasie des parathyroïdes observée lors de l'insuffisance rénale chronique pourrait partiellement être due directement au déficit d'action du 1,25-$(OH)_2D_3$.

#### ■ *Par la phosphatémie*

L'hypophosphatémie freine la sécrétion de PTH alors que l'hyperphosphatémie la stimule. L'existence d'un phosphate *sensing receptor* est évoqué (cotransporteur Na-phosphate ou un de ses régulateurs) mais non encore démontré.

#### ■ *L'acidose métabolique stimule la sécrétion de PTH*

*PTH et magnésium :* le magnésium n'est qu'un déterminant mineur dans la régulation de la sécrétion de la PTH. Cependant, une hypomagnésémie peut stimuler en conditions aiguës la sécrétion de PTH. Inversement, une hypomagnésémie intense et prolongée peut inhiber profondément la sécrétion de PTH.

### c) Modes d'action de la PTH

L'action de l'hormone sur ses cellules cibles passe par sa liaison à un récepteur commun à la PTH et au PTHrp (*PTH-related peptide*). Ce récepteur appartient à la superfamille des récepteurs liés à des protéines G et possédant sept domaines transmembranaires.

*La PTH* accroît la résorption osseuse. Son effet à court terme est secondaire à une augmentation de l'activité des ostéoclastes déjà présents dans le tissu osseux. Son action à plus long terme passe par le recrutement de nouveaux ostéoclastes et dans un deuxième temps de nouveaux ostéoblastes pour respecter l'équilibre du remodelage osseux.

Les récepteurs osseux de la PTH sont situés sur les ostéoblastes mais jusqu'à présent aucun récepteur n'a été identifié sur les ostéoclastes. L'hypothèse actuelle est que l'augmentation de l'activité ostéoclastique dépendant de la PTH est indirecte. Elle nécessite la sécrétion par les ostéoblastes de molécules diverses dont des cytokines : les substances les plus étudiées sont IGF-I et IGF-II (*insulin-like growth factor* de type I ou II), TGF-β, MCSF, IL-6, $PGE_2$... qui activeraient alors secon-

dairement les ostéoclastes. La PTH participe donc au remodelage osseux permanent qui est indispensable au bon équilibre de la structure osseuse et de la fonction métabolique de maintien de la calcémie. En effet, il existe un couplage permanent entre les phénomènes de synthèse osseuse assurée par les ostéoblastes et de résorption osseuse assurée par les ostéoclastes. La *figure 6* présente les intervenants dans la transformation de l'ostéoblaste en ostéoclaste : la cellule ostéoblastique a un facteur « Rank-ligand » (RANKL). En présence de facteurs permissifs ou inhibiteurs, RANKL active le facteur RANK porté par le précurseur de l'ostéoclaste et permet sa transformation en ostéoclaste. L'ostéoprotégérine (OPG) agit pour sa part comme un antagoniste de cette transformation ostéoblaste-ostéoclaste et stimule l'apoptose des ostéoclastes. La découverte récente du système OPG-RANKL a permis de comprendre certains des phénomènes de régulation du turn-over osseux et a permis d'envisager des voies thérapeutiques nouvelles, en particulier dans les maladies osseuses, tumeurs malignes, maladies cardio-vasculaires, etc.

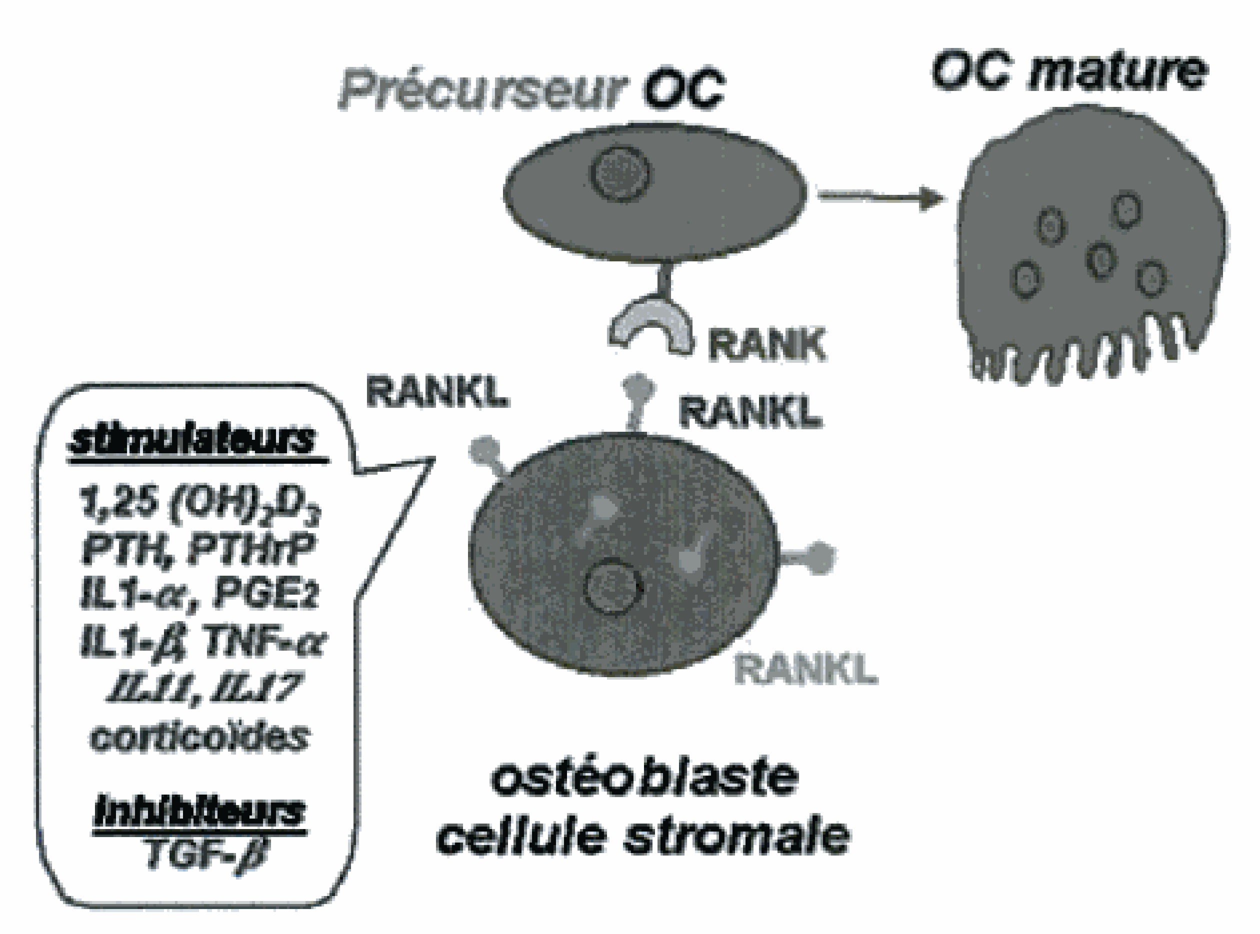



**Figure 6.** Régulation de la transformation de l'ostéoblaste-ostéoclaste

### d) Action rénale de la PTH

Elle a deux sites d'action : le tube contourné proximal où elle diminue la réabsorption du phosphate et le tube contourné distal où elle augmente la réabsorption du calcium (voir *supra*). Cela explique qu'à calcémie élevée identique, la calciurie soit plus faible dans l'hyperparathyroïdie primitive que dans d'autres étiologies, intoxication à la vitamine D par exemple.

### e) Globalement

L'action de la PTH est donc de réguler la calcémie :

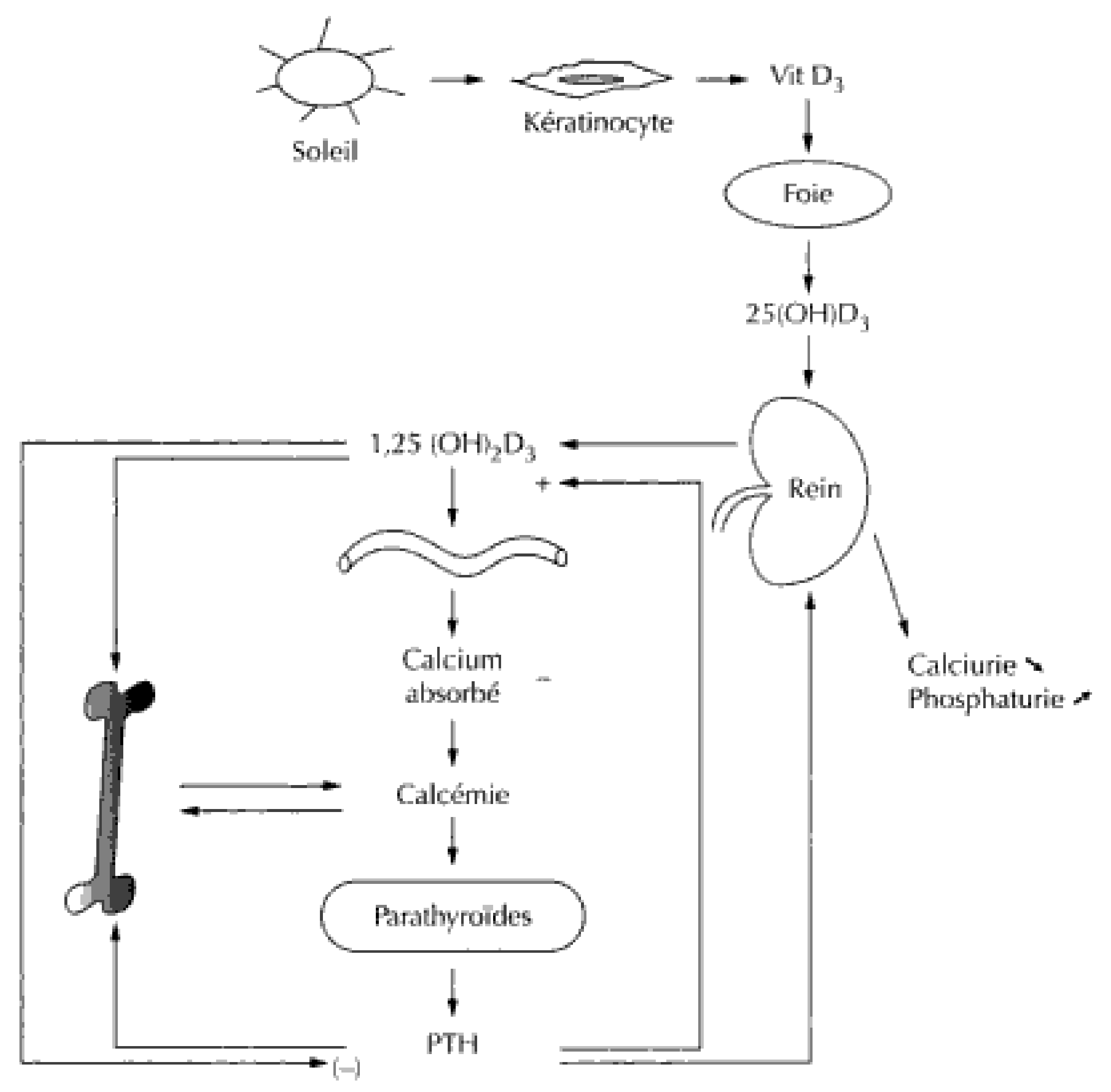
- en permettant la libération du calcium osseux ;
- en augmentant la réabsorption du calcium filtré ;
- en stimulant la synthèse du 1,25-$(OH)_2D_3$ qui va faciliter l'absorption intestinale du calcium.

## 4. Vitamine D

### a) Métabolisme

La vitamine D est un sécostéroïde produit par les couches profondes de l'épiderme sous l'action du rayonnement ultraviolet qui photolyse le 7-déhydrocholestérol en prévitamine D. Cette dernière s'isomérise spontanément en vitamine $D_3$. La vitamine $D_3$ (cholécalciférol), qui est biologiquement inerte, subit une hydroxylation en position 25 dans le foie (calcidiol) puis en 1 dans le tube proximal rénal et devient ainsi la 1,25-$(OH)_2D_3$ (calcitriol), qui est la forme hormonale active dela vitamine D (*fig.* 7). Le calcitriol a comme principale action l'homéostasie phosphocalcique et la régulation du métabolisme osseux en augmentant l'absorption intestinale du calcium et en recrutant les cellules souches osseuses pour former les ostéoclastes qui à leur tour vont mobiliser le calcium de l'os vers la circulation sanguine.

Le calcitriol est transporté dans le plasma lié à une protéine porteuse, *vitamin D-binding protein*, ou DBP, vers le tissu cible où il va pénétrer et interagir avec un récepteur intracellulaire de haute affinité (VDR) qui peut être cytosolique ou intranucléaire. La liaison de l'hormone à son récepteur entraîne un changement de conformation de ce dernier, lui conférant une affinité plus grande pour la chromatine (*fig.* 8). Le complexe hormone-récepteur se lie également à un récepteur de l'acide rétinoïque (RXR) pour former un complexe hétérodimérique. Il existe un équilibre entre les différentes formes de la vitamine liée dans la cellule, formes monomérique, homodimérique et hétérodimérique (VDR-RXR). Ce complexe subit une translocation vers le noyau où il se lie à un élément de réponse (VDHRE) présent dans l'ADN pour réguler des gènes sensibles à cette hormone (plus de cinquante gènes ont été répertoriés). Cette interaction conduit à la régulation, augmentation ou répression de la transcription des gènes et de la synthèse d'ARNm d'un grand nombre de protéines venant soit de l'ostéoblaste, comme l'ostéopontine, l'ostéocalcine, la phosphatase alcaline, le collagène, soit de l'intestin comme la protéine de liaison intestinale du calcium (*calcium-binding protein*, CaBP). Le gène du VDR a dernièrement beaucoup été étudié et des mutations aboutissant à un syndrome de résistance à la vitamine D ont été identifiées (rachitisme vitaminorésistant de type II). Des mutations dans les exons ou les introns du gène peuvent entraîner un polymorphisme de ce gène sans modification de la composition en acides aminés de la protéine, mais pourraient être responsables de réponses sensiblement différentes dans l'os ou l'intestin et jouer un rôle par exemple dans l'acquisition de la masse osseuse ou le développement de pathologies phosphocalciques, comme l'ostéoporose. Récemment, le rôle de certains polymorphismes dans le déterminisme de l'hypercalciurie idiopathique a été éliminé.

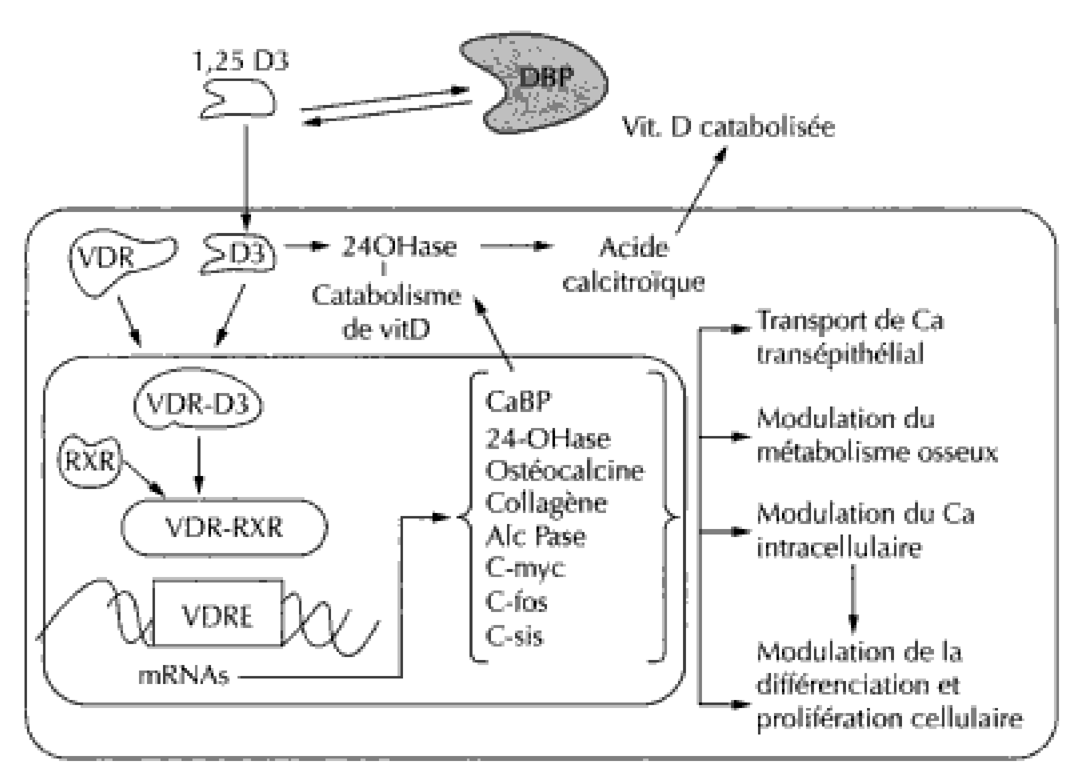



Les étapes de la synthèse de la forme active de la vitamine D, le $1,25\text{-}(OH)_2D_3$ ou calcitriol sont représentées. Le calcitriol agit sur l'intestin en augmentant l'absorption intestinale de calcium, sur l'os en participant au remodelage osseux et en facilitant sa minéralisation, sur la parathyroïde dont elle freine la sécrétion. La parathormone agit sur l'os en participant également au remodelage osseux, sur le rein en augmentant la réabsorption distale du calcium et en diminuant la réabsorption proximale de phosphate. La PTH stimule la synthèse rénale du calcitriol.

**Figure 7.** Régulation de la calcémie

### b) Régulation de la synthèse du calcitriol

La PTH stimule la synthèse de la 1,25 et ainsi entraîne indirectement une augmentation de l'absorption intestinale de calcium. L'augmentation de la calcémie entraîne alors une freination de la synthèse et de la libération de la PTH. En outre, par l'intermédiaire de ses récepteurs VDR dans la glande parathyroïde, le 1,25 entraîne une inhibition directe de la synthèse de PTH. Elle exerce également une action régulatrice sur le gène de la 1α-hydroxylase rénale. La calcémie semble donc n'avoir qu'une influence indirecte, *via* la PTH, sur la sécrétion du calcitriol. En revanche, la phosphatémie est un facteur de stimulation puissant de la 1α(OH)ase rénale : l'hypophosphatémie stimule et l'hyperphosphatémie déprime la sécrétion de calcitriol. De nombreuses hormones ou facteurs liés à la croissance, à la nutrition ou à l'équilibre calcique ont des actions sur la production de calcitriol. Les sujets âgés, en particulier, ont une diminution de la régulation du calcitriol par la PTH. Cela pourrait expliquer la diminution de l'absorption calcique observée à cet âge.




Le calcitriol pénètre dans la cellule, se fixe à son récepteur, VDR, pénètre dans le noyau où elle va former des complexes avec l'élément RXR et induire ensuite ou moduler les synthèses de protéines nécessaires au transport du calcium, à son catabolisme (24 hydroxylation), à la formation osseuse (ostéocalcine, phosphatases alcalines osseuses), et à la prolifération cellulaire (c-myc, c-fos, etc.).

**Figure 8.** Actions cellulaires de la forme active de la vitamine D, le 1,25-$(OH)_2D_3$

### c) Modes d'action

*Dans l'intestin*, l'action du calcitriol est d'activer la synthèse de nombreuses protéines nécessaires à l'absorption du calcium. La plus anciennement connue est la CaBP apicale, mais également la phosphatase alcaline, la Ca-ATPase basolatérale, et des protéines de la bordure en brosse intestinale. La 1,25 augmente l'absorption intestinale de calcium essentiellement dans le duodénum et celle du phosphate plutôt dans le jéjunum et l'iléon.

*Dans l'os*, le calcitriol induit la différenciation dans la moelle osseuse des cellules souches en ostéoclastes. Quand les ostéoclastes sont matures, ils perdent leur sensibilité à la 1,25 et ne seront régulés ensuite qu'indirectement *via* les ostéoblastes activés qui sécrètent alors des substances, interleukines entre autres, qui stimulent à leur tour l'activité ostéoclastique. Les ostéoblastes ont des récepteurs au calcitriol, récepteurs nucléaires, mais peut-être aussi récepteurs membranaires. L'action osseuse du calcitriol est principalement de favoriser le turn-over osseux et la minéralisation osseuse. Chez l'enfant, la vitamine D est indispensable à la maturation et la croissance osseuse. Ses concentrations plasmatiques sont plus élevées en phase de croissance rapide. Son déficit entraîne le rachitisme chez l'enfant et l'ostéomalacie chez l'adulte.

## 5. Calcitonine (CT)

La calcitonine est une hormone synthétisée par les cellules C de la thyroïde. Elle est hypocalcémiante, hypophosphatémiante et joue un rôle dans le métabolisme

phosphominéral osseux par action directe sur l'os et le rein. La CT réduit le catabolisme osseux par un effet inhibiteur sur les ostéoclastes dont elle freine l'activité, la mobilité, le nombre, le taux de renouvellement et l'activité sécrétoire : elle inhibe la libération d'hydroxylases acides de l'ostéoclaste et l'activité Na,K-ATPase. Directement ou indirectement, elle favorise l'activité ostéoblastique et donc l'augmentation de la masse osseuse. L'action hypocalcémiante de la CT est largement utilisée en thérapeutique dans la maladie de Paget dont elle réduit le turn-over osseux et dans l'hypercalcémie. Le cancer médullaire de la thyroïde est une des seules maladies dans lesquelles une anomalie de sécrétion de la calcitonine a été identifiée : la calcitonine est sécrétée en excès et la concentration plasmatique de CT est le marqueur spécifique de cette tumeur. Curieusement, aucune anomalie du bilan phosphocalcique n'est notable dans cette affection, évoquant une désensibilisation des récepteurs primitive ou secondaire à la sécrétion de CT.

# II. Métabolisme du phosphore

Le phosphore est avec le calcium le composant le plus important dans le squelette. Il est aussi très abondant dans les tissus mous. Il se trouve sous forme de phosphate minéral ou sous forme de phosphore organique (esters phosphoriques). Son poids moléculaire est de 31.

## A. Répartition du phosphore

Le phosphore total représente environ 20 moles, soit environ 600 g dont 85 % se trouvent dans l'os. Environ 15 % du phosphate se trouve dans les LEC et dans les tissus mous, et 85 % dans l'os sous forme cristalline.
*Liquides extracellulaires :* la masse totale de phosphate y est très faible, représentant environ 15 mmoles – soit moins de 0.1 % du phosphate total de l'organisme. *Dans le plasma*, la concentration de phosphate est comprise entre 0,8 et 1,5 mmol/L chez l'adulte. Elle est plus élevée chez l'enfant, comprise entre 1,6 et 2,4 mmol/L chez le nourrisson, s'abaissant progressivement lorsque l'enfant grandit. Environ 12 % des phosphates sont sous forme liée aux protéines, le reste étant sous forme libre, ionisée. Ils sont sous forme de phosphate monovalent pour 25 % et sous forme phosphate divalent pour 75 % au pH normal du sang de 7,40 (le pK des phosphates est de 6,80). *Dans le secteur intracellulaire*, sa concentration est difficile à évaluer. Il est essentiellement sous forme de phosphore organique dont le rôle fonctionnel est très important en particulier dans la synthèse de l'adénosine triphosphate (ATP), source énergétique de la cellule.

## B. Homéostasie

Le bilan du phosphate de l'organisme repose sur l'équilibre entre le régime alimentaire, l'absorption digestive, la réabsorption rénale et le stockage osseux sous

forme d'hydroxyapatite. La phosphatémie est régulée de façon moins étroite que la calcémie. Aucun « *phosphate sensor* » n'a encore été mis en évidence à ce jour. La phosphatémie dépend des apports alimentaires de phosphates et de leur absorption intestinale. De nombreux facteurs modulent cette absorption digestive. Enfin, le rein équilibre le bilan des phosphates en modulant la réabsorption tubulaire sous l'action des hormones calciotropes et surtout de la PTH.

## 1. Absorption intestinale

L'apport moyen journalier est de l'ordre de 30 à 50 mmoles et couvre toujours largement les besoins. L'absorption du phosphate se fait tout au long du tube digestif, y compris le côlon, de façon passive par la voie paracellulaire et de manière plus active par la voie transcellulaire, plutôt dans les parties proximales comme le duodénum. Contrairement à l'absorption du calcium, celle du phosphate n'est pas limitée : elle est proportionnelle aux apports alimentaires. L'identification des cotransporteurs Na-$PO_4$ présents dans le rein, l'intestin et l'os a constitué une avancée majeure de ces dernières années. Le calcitriol augmente l'absorption digestive en régulant des cotransporteurs apicaux de type 2b, Npt-2b, dans la bordure en brosse des entérocytes. Ces cotransporteurs jouent un rôle important dans la régulation de l'absorption intestinale lorsque le régime est carencé en phosphates. La présence en quantités importantes de calcium et de phosphates dans la lumière intestinale limite l'absorption du phosphate car elle entraîne une précipitation intestinale de sels de phosphate de calcium insolubles. Des chélateurs du phosphate (sels d'aluminium) ont été autrefois utilisés pour lier le phosphate et inhiber son absorption digestive chez le dialysé ou l'insuffisant rénal sévère afin d'abaisser la phosphatémie. De nos jours, cette prescription de sels d'aluminium est proscrite du fait des complications graves, en particulier encéphaliques et osseuses (os adynamique), qu'elle a pu entraîner.

## 2. Rein et phosphate

Le rein est l'organe de régulation de la phosphatémie. C'est la réabsorption tubulaire qui constitue le déterminant majeur contrôlant l'homéostasie du phosphate. Le phosphate libre est filtré par le glomérule et réabsorbé massivement dans le tube proximal (70 à 80 %). Le transport de phosphate couplé à celui du sodium constitue l'étape limitante de l'ensemble du processus. Ce transport de phosphate se fait grâce à des cotransporteurs sodium phosphate de type 2 (Npt-2a) qui se trouvent au niveau de la bordure en brosse du tube proximal. La PTH règle la réabsorption du phosphate *via* l'activation de ses récepteurs dans le TP. Elle entraîne une internalisation irréversible de ces transporteurs dans le tube proximal. De ce fait, la réabsorption du phosphate ne s'opère plus. Le contenu en phosphate du régime alimentaire provoque lui aussi des changements dans l'absorption intestinale du phosphate, représentant le phénomène connu depuis longtemps d'adaptation rénale directe du rein aux apports et aux besoins en phosphate. Il semble que ce soit l'abondance de Npt-2a au niveau apical qui soit le médiateur de cette réponse rénale directe, indépendante de la PTH, comme suggéré par les résultats de l'invalidation du gène de Npt-2a. En cas de restriction portant à la fois sur les apports

calciques et phosphatés, la stimulation de la sécrétion de PTH induite par la baisse de la calcémie devrait s'accompagner d'une augmentation inappropriée de la phosphaturie mais, grâce à ce système d'adaptation répondant spécifiquement au bilan phosphoré, le blocage de l'action phosphaturique de la PTH est alors réalisé. Les autres transporteurs de phosphate localisés dans le rein semblent avoir un rôle physiologique peu important. De nombreuses hormones et cytokines régulent la réabsorption rénale du phosphate : PTH et glucocorticoïdes la diminuent alors que GH, IGF-I, insuline, calcitriol, hormones thyroïdiennes l'augmentent.

Une régulation du cotransporteur NPT-2a a été mise en évidence récemment. Le *fibroblast growth factor 23*, FGF23, inhibe l'action de ce transporteur. De ce fait, une production anormalement élevée de ce facteur entraîne une perte rénale de phosphate et une hypophosphatémie. Le FGF23 agit également au niveau du tube contourné proximal en inhibant l'action de la 1$\alpha$-hydroxylase rénale et donc la synthèse du calcitriol. Il inhibe la formation osseuse au niveau osseux. Il a depuis peu été démontré que le rachitisme hypophosphatémique autosomique dominant (ADHR) a pour cause une augmentation du FGF23. De même, l'ostéomalacie oncogénique acquise est liée à l'augmentation de la synthèse du FGF23 par les cellules tumorales (*tab. 2*).

Le FGF23 est lui-même modulé par la présence de PHEX (*Phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome*). Ce gène, situé sur le chromosome X, inhibe l'expression du FGF23. Lorsqu'il est défectueux, il entraîne une augmentation de FGF23 et induit également un rachitisme hypophosphatémique lié à l'X (XLH, *X-linked hypophosphatemic rickets*).

L'excrétion des phosphates peut être exprimée en termes de taux de réabsorption des phosphates ou TRP. Ce taux est normalement compris entre 85 et 95 % des phosphates filtrés. Le seuil des phosphates ou Tm/GFR est un index plus précis. Son mode de calcul et ses limites seront développés dans le chapitre « *Exploration du métabolisme phosphocalcique et du métabolisme osseux* ».

**Tableau 2.** Caractéristiques des rachitismes ou Ostéomalacies hypophosphatémiques

| | XLH<br>X linked hypophosphatemic | ADHR<br>Autosomic dominant hypophosphatemic rickets | TIO<br>Tumor induced osteomalacia | HHRH<br>Hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria |
|---|---|---|---|---|
| Phosphatémie | basse | basse | basse | basse |
| Calcémie | normale | normale | normale | normale |
| 1,25-$(OH)_2D_3$ | bas/Nl | bas/Nl | bas/Nl | Nl/élevée |
| PTH | Nl/élevée | Nle | Nl/élevée | basse |
| Calciurie | Nle | Nle | Nle | élevée |
| Défaut dentaire | +++ | abcès dentaires | non | non |
| Faiblesse musculaire | +/– | ++ | +++ | +/– |
| Pénétrance | complète | incomplète | ////////// | ??? |
| Défaut | PHEX | FGF23 | Excès de FGF23 | NPT-2c |
| Chromosome | Xp.22.1 | 12p13 | acquis | 9 |

Mécanisme ← **NPT2a** abaissé dans le tube proximal → **NPT-2c**
← perte rénale de phosphate →

### 3. Os et phosphate

Du fait de la formation et de la résorption osseuse, il existe un transfert continu de phosphate entre l'os et le milieu extracellulaire. Dans les ostéoclastes, il existe certainement des transporteurs de phosphate. Le rôle direct de la phosphatémie dans le turn-over osseux est certain mais ses mécanismes ne sont qu'imparfaitement élucidés.

## C. Principales anomalies de la phosphatémie

L'excrétion urinaire des phosphates est diminuée et, par conséquent, la phosphatémie augmentée lors d'une insuffisance rénale quelle qu'en soit la cause : le TRP est alors diminué, < 80 %. L'hyperparathyroïdie primitive entraîne une augmentation de l'excrétion urinaire des phosphates et ainsi une hypophosphatémie. Inversement, une hyperphosphatémie peut être observée en cas d'hyporathyroïdie. Une sécrétion anormale de PTHrp (*PTH-related peptide*) entraîne les mêmes anomalies que celles observées avec une hyperparathyroïdie.
La phosphaturie peu être augmentée lors de traitement à dose pharmacologique de calcitonine ou de glucocorticoïdes, ou lors d'une acidose, métabolique ou respiratoire. Les pathologies liées à une anomalie du transport du phosphate sont en cours de démembrement. En particulier, le rachitisme vitamino-résistant lié à l'X, associant une hypophosphatémie majeure à un rachitisme sévère, a pu être attribué à un défaut de transport rénal du phosphate.

# III. Principaux syndromes affectant le métabolisme phosphocalcique

## A. Pathologie parathyroïdienne

*Hypoparathyroïdie* : le défaut de sécrétion de PTH peut être congénital ou non (parathyroïdectomie par exemple). Le syndrome biologique associe une hypocalcémie totale et ionisée, une hyperphosphatémie, une hypophosphaturie. La concentration de PTH est basse, inadaptée à la calcémie.
*Hyperparathyroïdie primitive ou secondaire* : l'hyperparathyroïdie primitive associe une hypercalcémie totale et ionisée, une hypophosphatémie, une hypercalciurie et un TRP ou un Tm/GFR abaissé. La PTH est élevée, inadaptée à la calcémie, et le taux plasmatique de 1,25-$(OH)_2D_3$ est souvent également augmenté. L'hyperparathyroïdie secondaire associe au contraire une PTH élevée à une hypocalcémie ionisée. Cette situation est généralement réversible avec la correction de la calcémie. Cependant, dans quelques cas d'hyperparathyroïdie chronique, on peut voir s'autonomiser la sécrétion de PTH. Il s'agit alors d'une hyperparathyroïdie dite « tertiaire ».
*Sécrétion tumorale de PTHrp* : certaines tumeurs malignes, en particulier pulmonaires, sécrètent du PTHrp (sécrétion paranéoplasique) qui agit sur les mêmes récepteurs que la PTH et mime l'hyperparathyroïdie primitive. La seule différence du tableau biologique repose sur le dosage de la PTH sérique qui est alors effondrée.

## B. Pathologie de la vitamine D

### 1. Déficit en vitamine D

Le rachitisme carentiel chez l'enfant est actuellement très peu fréquent en France : ce syndrome, dû à un déficit en calcitriol sur un organisme en période de croissance, associe des anomalies phosphocalciques plasmatiques (diminution de l'absorption intestinale du calcium, tendance hypocalcémique ou hypocalcémie vraie avec ses éventuelles conséquences cliniques, hyperparathyroïdie réactionnelle), et le défaut d'action de la vitamine D sur l'os en maturation et croissance. Le retard de croissance est constant. Les lésions osseuses sont radiologiquement caractéristiques : élargissement des métaphyses (aspect en bouchon de champagne des extrémités costales antérieures), os clair, retard de l'âge osseux, etc. Le diagnostic est biologique et repose sur le dosage du dérivé 25 hydroxylé de la vitamine D qui représente le pool circulant du précurseur du calcitriol.
L'ostéomalacie est le corollaire du déficit vitaminique D mais chez l'adulte : le défaut d'absorption digestive du calcium et du phosphate entraîne un défaut de minéralisation osseuse et une fragilité osseuse. Là encore, le taux de 25-(OH)$D_3$ est effondré, souvent inférieur à 5 ng/ml. Les causes en sont diverses, carentielles, malabsorption digestive, défaut d'hydroxylation hépatique en position 25 du cholécalciférol dû à une induction enzymatique (barbituriques, diphénylhydantoïnes…) accélérant le catabolisme hépatique de la vitamine D.

### 2. Intoxication à la vitamine D

Le diagnostic est évoqué devant un syndrome associant une hypercalcémie et une hypercalciurie majeure. La phosphatémie n'est pas aussi abaissée que dans une hyperparathyroïdie primitive. Le diagnostic est biologique et repose sur le dosage plasmatique de la 25-(OH)$D_3$.

## C. Insuffisance rénale et ostéodystrophie rénale

L'ostéodystrophie rénale est un ensemble d'anomalies complexes du métabolisme phosphocalcique lié à l'insuffisance rénale. Schématiquement, l'insuffisance rénale induit une rétention phosphatée et un défaut de synthèse du dérivé actif de la vitamine D (défaut quantitatif de la 1$\alpha$-hydroxylase rénale). De ce fait, l'absorption digestive de calcium est diminuée, la calcémie tend à baisser et il se produit une hyperparathyroïdie secondaire, tendant à normaliser la calcémie ionisée et à permettre une plus grande élimination des phosphates par les néphrons restants. Le résultat sur le plan sanguin est le plus souvent imparfait, en particulier au niveau de la phosphatémie. À l'échelle osseuse, l'hyperparathyroïdie secondaire entraîne une lyse non compensée et le défaut d'action de la vitamine D aggrave encore les lésions, aboutissant au tableau dit d'ostéodystrophie rénale.

## D. Pathologie liée à une lyse osseuse

La lyse osseuse, liée le plus souvent à l'existence de métastases osseuses, entraîne une augmentation de la calcémie et de la phosphatémie, une freination de la sécrétion de PTH, une hypercalciurie. Dans ce cas, le PTHrp n'est pas détectable.

## E. Autres

Les anomalies du gène codant pour le « *calcium sensing receptor* » :

- *mutations inactivatrices* : ces dernières années, la cause du syndrome d'hypercalcémie-hypocalciurie familiale a pu être identifiée. Ce syndrome, de transmisson autosomique dominante, sous forme hétérozygote, est dû à des mutations inactivatrices du gène du CaSR. Une anomalie de réponse de la parathyroïde à la calcémie ionisée est alors observée, la PTH n'étant plus freinée par la calcémie et entraînant une déviation de la courbe de réponse PTH-$Ca^{++}$ (*fig. 4*). De même, la calciurie est basse, malgré l'hypercalcémie, preuve du mauvais fonctionnement du CaSR dans l'anse de Henlé. Sous forme homozygote ou de double hétérozygotie, la mutation inactivatrice du gène codant pour le CaSR entraîne une hyperparathyroïdie très sévère de début néonatal ;
- *mutations activatrices* : une mutation entraînant une activation du CaSR entraîne, en revanche, un syndrome d'hypoparathyroïdie sévère de début néonatal, associé parfois à des anomalies hydrominérales, alcalose hypokaliémique, hypercalciurie avec néphrocalcinose, évoquant un syndrome de Bartter. Dans ce cas, le traitement de l'hypocalcémie par l'association de calcium et de vitamine D entraîne une exagération d'hypercalciurie très caractéristique ;
- *les malabsorptions digestives*, quelle qu'en soit la cause, peuvent entraîner des défauts d'absorption de calcium, de phosphate et de vitamine D et une hyperparathyroïdie secondaire ;
- *la sarcoïdose* peut entraîner une hypercalcémie associée à une hypercalciurie intense : en effet les cellules macrophagiques des granulomes sarcoïdosiques peuvent synthétiser du calcitriol ;
- *les maladies endocriniennes* touchant la thyroïde, l'hormone de croissance, les gluco- et les minéralocorticoïdes peuvent également affecter le métabolisme phosphocalcique. Le diagnostic repose alors sur les dosages spécifiques des hormones du système endocrinien impliqué ;
- *les maladies congénitales rares* liées à des anomalies génétiques ne seront pas décrites ici mais certaines causes récemment identifiées des rachitismes ou ostéomalacies hypophosphatémiques sont regroupées à titre indicatif dans le *tableau* 2.

***Pour en savoir plus***

- Bonjour J.-P., Rizzoli R., Buchs N. *et al.* Métabolisme du phosphate : régulation de la phosphatémie. *Rev Rhum* (suppl. pédagogique), 1999 : 66, 207-14.
- Drüeke T.B., Lacour B. « Homéostasie du calcium et du phosphore » in *Maladies métaboliques osseuses de l'adulte*. D. Kuntz, Flammarion Médecine-Sciences, 1996 : 115-37.
- Bushinsky D.A., Monk R.D. Calcium. *Lancet*, 1998 : 306-11, 352.
- Hoenderop J.G.J., Willems P.H.G.M., Bindels R.J.M. Toward a comprehensive molecular model of active calcium reabsorption. *Am J Physiol. Renal physiol*, 2000, 278, F352-F360.
- Holick M.F. « Vitamin D : photobiology, metabolism, mechanism of action and clinical applications » in *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 1999, 92-8 ; 4^e^ éd., Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphie, États-Unis.

# Physiologie des surrénales

J.-M. VILLETTE, J. FIET
Biologie hormonale, Hôpital Saint-Louis, AP-HP, Paris.
J. GUÉCHOT, Biochimie – Hormonologie, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris (révision 2007).

*Petites par leur taille mais grandes par leurs fonctions, les glandes surrénales, pesant seulement 5 à 10 g, sont vitales. En leur absence, la mort survient en quelques jours. Les troubles liés à leur hypofonctionnement sont assez rares, ceux qui sont associés à leur hyperfonctionnement sont un peu plus communs. Des hormones synthétiques similaires à leurs sécrétions naturelles sont largement utilisées dans le traitement de nombreuses maladies.*
*La fonction globale des surrénales est de protéger l'organisme contre les agressions aiguës ou chroniques. Les hormones stéroïdes de la zone corticale et les catécholamines de la partie médullaire assurent le développement d'un état protecteur contre les agressions brutales (stress, blessures, etc.) et facilitent la résistance corporelle à la privation d'eau et de nourriture. Dans les états de stress aigu, les catécholamines provoquent une mobilisation du glucose et des acides gras pour alimenter la consommation énergétique et préparent le cœur, les poumons et les muscles à l'action. Les glucocorticoïdes protègent contre les réactions exagérées de l'organisme aux agressions, réactions susceptibles de menacer l'homéostasie. Dans les états de privation d'eau et de nourriture, les stéroïdes corticosurrénaliens stimulent la gluconéogenèse pour maintenir l'apport en glucose et augmentent la réabsorption du sodium pour maintenir le volume liquidien de l'organisme.*

# I. Anatomie

Les glandes surrénales sont deux formations d'aspect pyramidal localisées, comme leur nom l'indique, au-dessus des reins (*fig. 1*).
En relation avec leurs fonctions essentielles, elles sont particulièrement bien vascularisées en sang artériel par de nombreuses artérioles provenant de l'aorte, des artères rénales et des artères phréniques. Par gramme de tissu, elles ont un des débits sanguins les plus élevés de l'organisme. Le sang artériel pénètre par le cortex externe, circule par des réseaux capillaires entre des cordons de cellules puis est collecté à l'intérieur dans des veinules de la zone médullaire. À droite, la veine surrénale se jette directement dans la veine cave inférieure. À gauche, elle pénètre dans la veine rénale gauche.

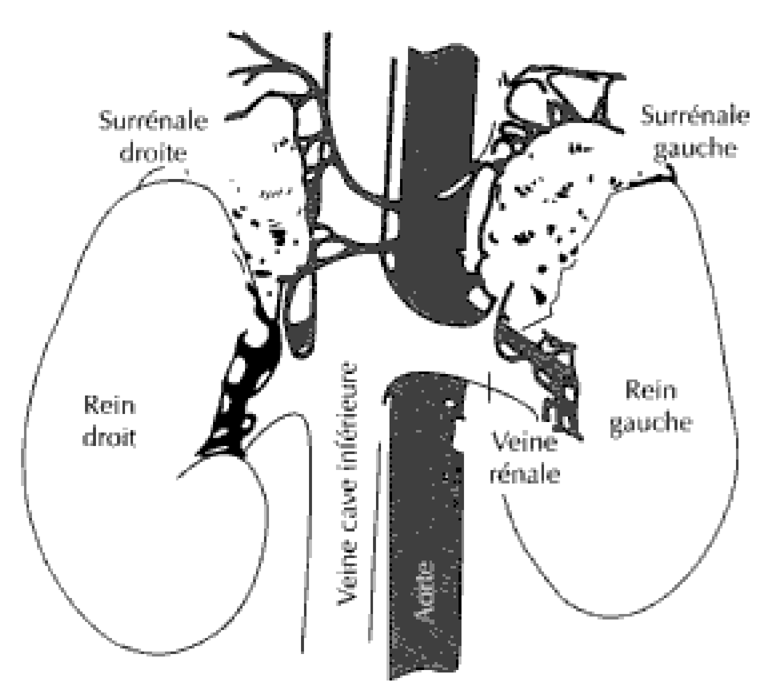



**Figure 1.** Schéma anatomique des glandes surrénales

## A. Zones histologiques

La partie corticale dérive du mésoderme. D'aspect jaunâtre, elle constitue 80 à 90 % de la glande. Sous une capsule fibreuse, elle se compose de trois zones dont les noms proviennent de leur arrangement cellulaire : la zone glomérulée externe, la zone fasciculée moyenne et la zone réticulée interne (*fig. 2*). Les principales sécrétions de ces trois zones sont aussi différentes que les mécanismes responsables de la régulation de leur activité (*tab. 1*).

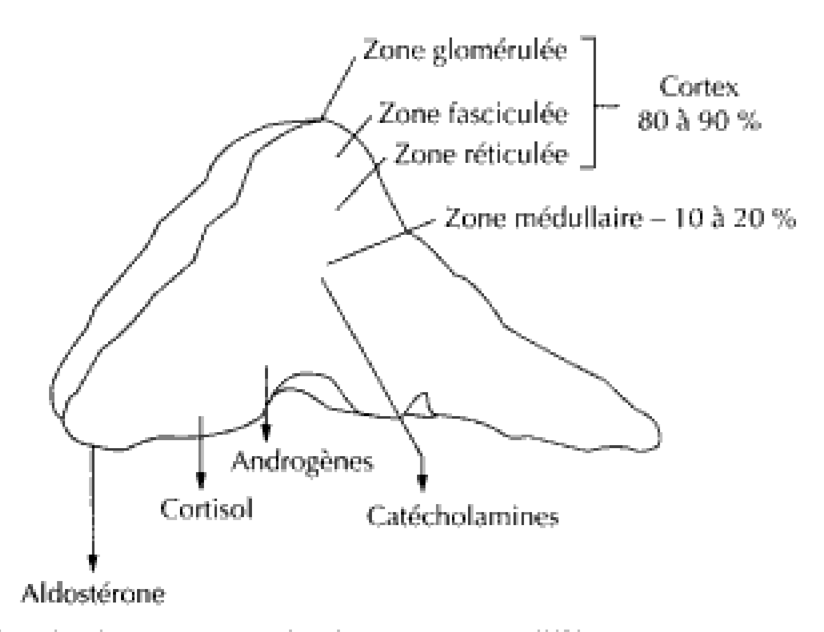



**Figure 2.** Sécrétion des hormones surrénaliennes par les différentes zones du cortex surrénalien

**Tableau 1.** Zones fonctionnelles du cortex surrénalien

| Zone | Sécrétion principale | Mécanisme régulateur principal |
|---|---|---|
| Z. glomérulée | Aldostérone (minéralocorticoïdes) | Rénine angiotensine |
| Z. fasciculée | Cortisol (glucocorticoïdes) | ACTH |
| Z. réticulée | Déhydroépiandrostérone (androgènes) | ACTH |

La partie médullaire, qui dérive de cellules neuroectodermiques, synthétise et sécrète les catécholamines. Alors que la noradrénaline est le principal neurotransmetteur sécrété par les neurones et les ganglions sympathiques, la médullosurrénale produit essentiellement de l'adrénaline à cause de la présence exclusive dans ce tissu de N-méthyl transférase, enzyme transformant la noradrénaline en adrénaline.

Chez le fœtus, les glandes surrénales sont beaucoup plus grosses par rapport au poids corporel que chez l'adulte. En taille absolue, elles sont, à terme, presque aussi grosses que les reins. Le cortex surrénalien fœtal ne comporte que deux zones : une zone sous-capsulaire externe, précurseur des trois zones corticales postnatales, et une zone interne beaucoup plus développée, représentant près de 80 % du cortex. Les cellules du cortex interne fœtal sont très actives car la 3β-ol-déshydrogénase, enzyme nécessaire pour transformer les stéroïdes précurseurs en gluco- ou minéra-

locorticoïdes, n'est pas très fonctionnelle. Ces cellules produisent de grandes quantités de déhydroépiandrostérone (DHA ou DHEA) ou prastérone qui sert de précurseur pour la synthèse des estrogènes par le placenta. Après la naissance, la zone corticale fœtale interne s'involue rapidement et la partie sous-capsulaire externe se différencie pour former les trois zones corticales de la surrénale postnatale.

## B. Zones fonctionnelles

La disposition anatomique des vaisseaux sanguins du cortex externe vers la zone médullaire interne est probablement responsable de la différenciation des sécrétions des différentes zones de la corticosurrénale. Les cellules sous-capsulaires sont capables de donner naissance aux trois zones corticales. Conformément à l'une des théories sur leur différenciation, les cellules les plus jeunes seraient situées sous la capsule, formant la zone glomérulée et, au fil du temps, elles migreraient vers l'intérieur. Les cellules de la zone réticulée, étant les plus vieilles, auraient un faible taux de division cellulaire, une pigmentation plus prononcée et d'autres signes d'une perte progressive d'activité fonctionnelle.

Outre le vieillissement, les sécrétions stéroïdiennes semblent également intervenir sur la différenciation des trois zones corticales en modulant leurs mécanismes enzymatiques. En effet, lorsque les cellules de chaque zone sont enlevées de leur structure anatomique naturelle, elles présentent le même type de sécrétion. Il semblerait que les stéroïdes eux-mêmes ainsi que les sous-produits métaboliques de la synthèse stéroïdienne, en particulier ceux provenant de la peroxydation des lipides, soient responsables d'une inactivation enzymatique progressive. Ainsi, les complexes enzymatiques responsables de la transformation des stéroïdes précurseurs en aldostérone au niveau de la zone corticale externe sont rapidement inactivés lorsqu'ils sont en contact avec des concentrations trop élevées soit de stéroïdes, soit de peroxydes lipidiques. Il en résulte que l'aldostérone ne peut plus être synthétisée par les cellules situées sous la zone corticale externe. De façon identique, de fortes concentrations de stéroïdes sont susceptibles d'inhiber les hydroxylases des cellules de la zone corticale la plus interne, rendant impossible la conversion des précurseurs en cortisol, d'où une sécrétion par cette zone du premier des stéroïdes de la voie des androgènes, la déhydroépiandrostérone ou DHA. De plus, les fortes concentrations en peroxydes dans la zone réticulée, la plus interne, sont vraisemblablement responsables de la sénescence et de la mort cellulaire dans cette zone.

La disposition des vaisseaux sanguins entre le cortex externe et la médullaire interne semble également permettre le maintien de taux élevés de synthèse et de sécrétion de la principale catécholamine nécessaire à la réponse au stress aigu : l'adrénaline. L'enzyme responsable de la transformation de la noradrénaline en adrénaline, la N-méthyltransférase, est spécifiquement induite par le cortisol, principal stéroïde sécrété par le cortex. En conséquence, après la réponse immédiate au stress par libération de l'adrénaline stockée, la sécrétion de cortisol va permettre d'assurer une synthèse continue de catécholamines.

# II. Physiologie de la corticosurrénale

## A. Stéroïdogenèse corticosurrénalienne

Tous les stéroïdes surrénaliens dérivent du cholestérol par différentes modifications de sa structure (*fig. 3*). Le cholestérol peut être soit synthétisé au sein de la surrénale à partir de l'acétyl-CoA, soit, pour la plus grande partie, capté à partir du sang grâce à des récepteurs membranaires spécifiques qui fixent les lipoprotéines-LDL riches en cholestérol. Ces lipoprotéines sont transférées à l'intérieur des cellules par endocytose. Le cholestérol est libéré des lipoprotéines, estérifié et stocké dans des vacuoles cytoplasmiques. La stimulation par l'adrénocorticotrophine hypophysaire (ACTH) active la cholestérol estérase qui libère le cholestérol de ses sites de stockage, fournissant ainsi le substrat aux enzymes de la synthèse stéroïdienne.

La synthèse des différentes hormones corticosurrénaliennes fait intervenir les enzymes du cytochrome P-450, notamment différentes oxygénases catalysant des hydroxylations du noyau stéroïde. Le facteur limitant de la biosynthèse est la première étape enzymatique où la chaîne latérale du cholestérol est scindée par la 20,22-desmolase du cytochrome P-450 pour conduire à la prégnénolone. Tous les stimuli de la stéroïdogenèse, et en particulier l'ACTH, augmentent l'interaction du cholestérol avec l'enzyme scindant la chaîne latérale.

Lorsque la prégnénolone est formée, elle subit les actions séquentielles de déshydrogénases et d'hydroxylases au sein du réticulum endoplasmique et des mitochondries pour conduire aux trois principales classes d'hormones surrénaliennes.

## B. Sécrétions stéroïdiennes

Les principales hormones sécrétées par la corticosurrénale (*tab. 2*) sont le cortisol, l'aldostérone et la déhydroépiandrostérone (DHA). L'essentiel de la DHA est sulfaté et les taux plasmatiques de sulfate de DHA sont bien plus élevés que ceux de l'hormone libre. Ces hormones ne sont pratiquement pas stockées dans les surrénales. Leur biosynthèse est activée en fonction des besoins, en particulier par stimulation de la réaction de la 20,22-desmolase.

**Tableau 2.** Taux de sécrétion et concentrations plasmatiques des principales hormones corticosurrénaliennes.

| Classe | Stéroïde | Taux de sécrétion (mg/jour) | Concentration plasmatique (ng/ml) |
|---|---|---|---|
| Glucocorticoïde | Cortisol<br>Corticostérone | 8-25<br>1-4 | 60-230<br>2-6 |
| Minéralocorticoïde | Aldostérone<br>Désoxycorticostérone | 0,05-0,20<br>0,1-0,6 | 0,05-0,20<br>0,05-0,20 |
| Androgènes | DHA<br>DHA sulfate<br>Δ4-androstènedione | 7-15<br><br>2-3 | 2-8<br>400-1 200<br>1-2 |

La numérotation conventionnelle des atomes du cholestérol figure dans l'encadré.

Les abréviations suivantes ont été utilisées pour les enzymes : 20,22-Des, 20,22-desmolase ; 17,20-Des, 17,20-desmolase ; 3β-HSD, 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase ; 17β-HSB, 17β-hydroxystéroïde déshydrogénase ; 17-OH, 17-hydroxylase ; 21-OH, 21-hydroxylase ; 11-OH, 11-hydroxylase ; 18-OH, 18-hydroxylase et 18-HSD, 18-hydroxystéroïde déshydrogénase.

**Figure 3.** Principales voies de synthèses des stéroïdes surrénaliens

Quelques précurseurs des principaux produits terminaux sont également sécrétés par les surrénales. Ils sont en général moins actifs et sont retrouvés à des concentrations plus faibles sauf dans les déficits congénitaux pouvant toucher les différentes enzymes de la synthèse stéroïdienne.

## C. Glucocorticoïdes

Le cortisol est le principal glucocorticoïde retrouvé chez l'homme et la plupart des mammifères alors que la corticostérone remplit ce rôle chez les rongeurs.

### 1. Régulation de la sécrétion des glucocorticoïdes

La sécrétion corticosurrénalienne est contrôlée principalement par l'adrénocorticotrophine hypophysaire ou ACTH, hormone peptidique sécrétée par l'antéhypophyse en réponse à la corticolibérine ou CRH d'origine hypothalamique (*fig.* 4).

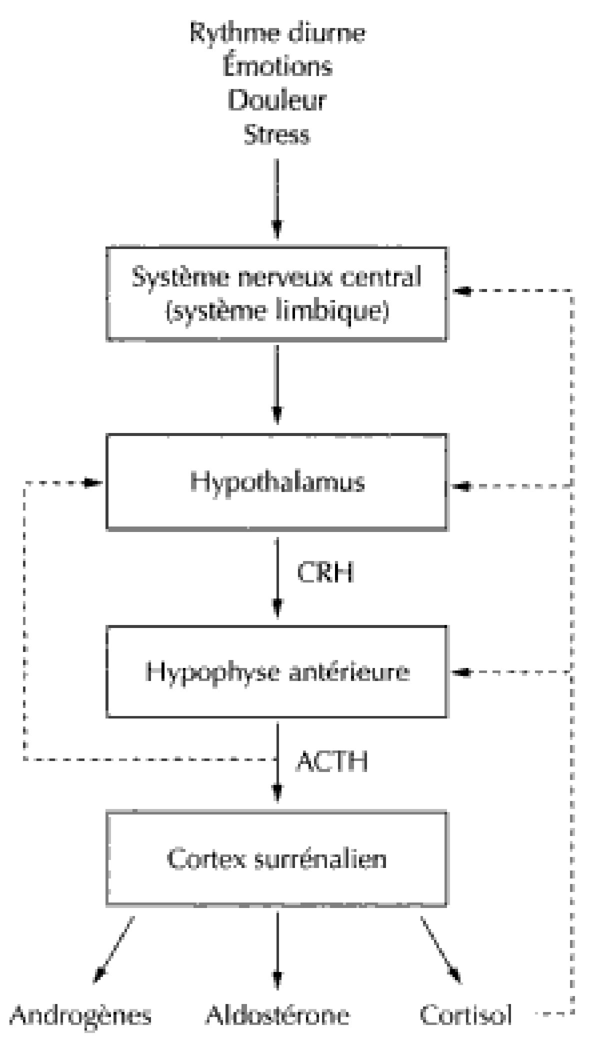
#### a) Action de l'ACTH

L'ACTH sécrétée par l'hypophyse antérieure exerce ses effets sur les cellules des trois zones de la corticosurrénale. Après liaison à ses récepteurs membranaires surrénaliens, l'ACTH provoque une activation de l'adénylate cyclase, augmentant l'AMP cyclique et activant ainsi les protéines kinases qui convertissent les esters du cholestérol en cholestérol libre. En plus de cet effet, l'ACTH stimule la 20,22-desmolase, activant ainsi la conversion du cholestérol en Δ5-prégnénolone d'où une stimulation des réactions de biosynthèse en cascade vers le cortisol.
Les taux plasmatiques de cortisol commencent à s'élever dans les minutes qui suivent une injection intraveineuse d'ACTH, puis augmentent de deux à cinq fois en l'espace de trente minutes. Dans les cas de stimulations chroniques par l'ACTH, la masse de tissu surrénalien augmente et la sécrétion de cortisol peut atteindre 200 à 250 mg/jour, soit dix à vingt fois la sécrétion basale normale.

#### b) Sécrétion surrénalienne des glucocorticoïdes

■ *Rythmes spontanés*

Lorsque la concentration plasmatique du cortisol est mesurée toutes les vingt minutes durant une période de 24 heures, on observe des fluctuations irrégulières. Des élévations rapides de la cortisolémie, correspondant à des périodes de sécrétions, surviennent de sept à treize fois par jour selon un schéma à peu près identique chez tous les individus. Ces épisodes sécrétoires suivent de quinze à trente minutes ceux de l'ACTH plasmatique. Globalement, la cortisolémie est plus élevée le matin au moment du réveil et diminue progressivement au cours de la journée puis de la soirée pour atteindre un minimum durant les deux premières heures suivant l'endormissement. Les taux remontent ensuite progressivement durant les dernières phases du sommeil pour atteindre un maximum au moment du réveil. Ce rythme circadien de la cortisolémie avec des taux élevés matinaux et des taux bas nocturnes est présent chez tous les sujets avec une vie active diurne et un sommeil nocturne. Le ou les facteurs agissant sur l'hypothalamus pour régler la durée et la fréquence des épisodes sécrétoires selon ce rythme ne sont pas connus.




Les flèches en traits pleins indiquent une stimulation, celles qui sont en pointillé un effet inhibiteur.

**Figure 4.** Mécanismes de régulation de la sécrétion des glucocorticoïdes

Le rythme circadien de la cortisolémie peut être modifié en décalant la période de sommeil (travailleurs nocturnes, voyageurs soumis à un décalage horaire important, etc.), mais seulement si le changement est maintenu plusieurs jours. Chez les animaux nocturnes comme le rat, la période de sommeil est inversée, ce qui entraîne un pic de sécrétion de corticostérone (principal glucocorticoïde chez cet animal) durant la nuit et un taux circulant minimum durant le jour. Les variations diurnes de la cortisolémie ne se produisent pas chez l'enfant avant l'âge d'un an et n'atteignent pas celles de l'adulte avant trois ans. Cela s'expliquerait par les périodes d'éveil et de sommeil différentes des jeunes enfants.

Les sécrétions épisodiques ne sont pas une conséquence d'un taux plasmatique abaissé de glucocorticoïdes entraînant une sécrétion d'ACTH. Les faibles concentrations de cortisol retrouvées dans les premières heures du sommeil ne provoquent pas de sécrétion d'ACTH et la cortisolémie élevée durant la phase de sécrétion principale ne supprime pas la libération continue d'ACTH pendant cette phase. Les sécrétions épisodiques et rythmiques d'ACTH persistent dans l'insuffisance surrénalienne correctement supplémentée. Il apparaît donc que la fonction corticosurrénalienne est modulée rythmiquement par le système hypothalamo-hypophysaire, opérant par l'intermédiaire de l'ACTH, en réponse à une stimulation cyclique provenant notamment du système limbique.

■ *Réponse surrénalienne au stress*

Différents stimuli psychologiques (anxiété, émotions fortes, etc.) ou physiques (blessures, brûlures, opérations chirurgicales, hypoglycémie, exposition au froid, hypotension, hypovolémie, exercices physiques violents, etc.) réalisent un tableau d'agression ou stress susceptible d'augmenter la libération d'ACTH et donc l'activité corticosurrénalienne. Suivant la durée et l'intensité de ces stimuli, la stimulation surrénalienne peut être aiguë ou chronique. Les stimulations aiguës se caractérisent par une libération simultanée de glucocorticoïdes et d'adrénaline par les surrénales alors que les stimulations chroniques se traduisent principalement par une sécrétion de glucocorticoïdes.

### c) Métabolisme

Lorsqu'il parvient dans la circulation sanguine, le cortisol se lie pour la plus grande partie (75 à 80 %) à une α2-globuline spécifique : la transcortine ou CBG (*corticosteroid-binding globulin*). Cette protéine de liaison spécifique, à un taux normal de 30 à 40 mg/L, est saturée pour une cortisolémie de 280 ng/ml. De la fraction de cortisol non liée à la transcortine, la majorité se fixe à l'albumine (15 à 20 % de la cortisolémie totale), mais moins fortement qu'à la transcortine, et le reste, soit à peu près 5 % du cortisol circulant, est retrouvé sous forme libre qui serait la forme physiologiquement active, capable de pénétrer au niveau des cellules.
La synthèse de la transcortine est réalisée par le foie. Elle est stimulée par les estrogènes comme celle des autres protéines de liaison des hormones. Lorsque le taux de transcortine augmente, la quantité de cortisol lié est plus importante. Il en résulte que les femmes recevant des estrogènes exogènes (estroprogestatifs) ou ayant des taux endogènes élevés possèdent un cortisol plasmatique total augmenté, mais comme leur cortisol libre est normal, elles ne présentent pas de manifestation d'excès de cortisol. D'un autre côté, les taux de transcortine sont abaissés dans les affections où la concentration des protéines plasmatiques est diminuée, comme dans la cirrhose hépatique. Dans ce cas également, le taux de cortisol libre est normal.
La demi-vie du cortisol exogène est de 70 à 90 minutes. Le cortisol peut être transformé en son analogue 11-céto, la cortisone, le premier glucocorticoïde isolé et utilisé en thérapeutique. La plus grande partie du cortisol et de la cortisone est métabolisée au niveau du foie en dérivés tétrahydrogénés puis conjuguée en glucuronides. Les glucuronides sont plus hydrosolubles et représentent les principales formes excrétées dans l'urine. La mesure de ces métabolites dans l'urine par des méthodes colorimétriques, comme celle des 17-hydroxystéroïdes, ont été pendant longtemps les méthodes les plus utilisées pour mesurer la production de cortisol. Actuellement, les taux plasmatiques et urinaires de cortisol sont mesurés par des méthodes radio-immunologiques ou immunoenzymatiques.
Actuellement, l'excrétion urinaire des 24 heures du cortisol non métabolisé est certainement la méthode la plus précise pour apprécier la production de cortisol. Seul le cortisol libre est excrété dans l'urine et le cortisol libre urinaire, dans la population normale, n'excède pas 100 µg/24 heures. Lorsque la sécrétion cortisolique augmente et que la cortisolémie atteint des taux de 250 à 300 ng/ml, la capacité de liaison de la transcortine est dépassée, le taux de cortisol libre augmente et une plus grande quantité de cortisol est filtrée au niveau rénal puis excrétée dans l'urine.

## 2. Action des glucocorticoïdes

Le cortisol est essentiel à la vie pour un ensemble de raisons qui ne sont pas toujours bien connues. D'une façon simplifiée, le cortisol apparaît nécessaire au maintien d'un ensemble de processus susceptibles d'être altérés à la suite de stress prolongé et pour juguler les manifestations secondaires des réactions inflammatoires. La plupart des effets du cortisol sont permissifs, c'est-à-dire non directement responsables du déclenchement de réactions métaboliques ou circulatoires mais nécessaires à leur totale expression.

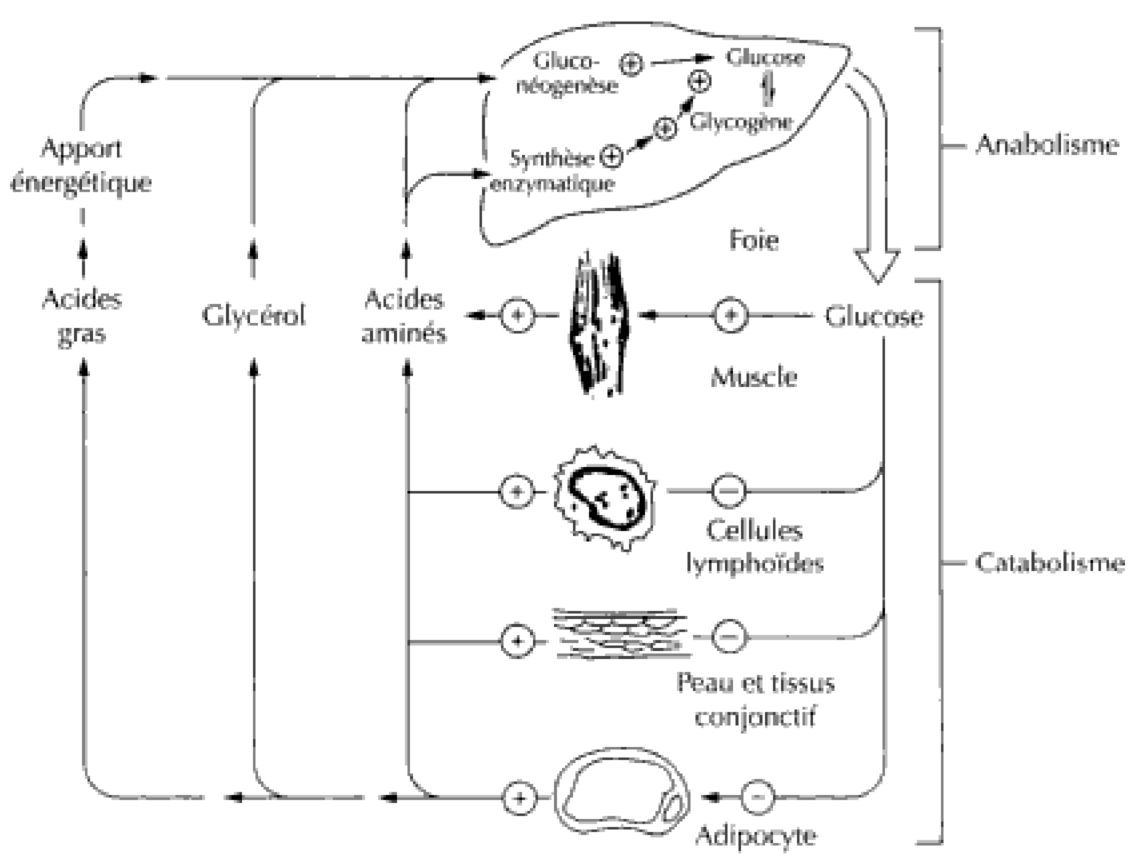



**Figure 5.** Actions des glucocorticoïdes sur les tissus périphériques.
Les signes « + » indiquent une stimulation, les signes « – » une inhibition

### a) Actions sur le métabolisme intermédiaire

L'ensemble des effets anaboliques et cataboliques du cortisol est représenté dans la *figure* 5. L'effet prédominant du cortisol est catabolique et consiste à faciliter la transformation des protéines des muscles et du tissu conjonctif en glucose et glycogène. Cette glycogenèse est la résultante d'une augmentation de la dégradation des protéines déjà formées et d'une diminution de la synthèse des nouvelles protéines. Cette synthèse de glucose à partir des acides animés joue un rôle très important durant un jeûne prolongé où le glucose circulant et les stocks hépatiques de glycogène seront consommés en moins de 24 heures.

### b) Actions sur le métabolisme glucidique

Le cortisol provoque non seulement une augmentation de l'apport en glucose en stimulant la néoglucogenèse, mais diminue également l'utilisation du glucose par les cellules. La stimulation de la néoglucogenèse reflète une activation de la transcription

de l'ADN au niveau des hépatocytes entraînant une augmentation des différentes enzymes impliquées dans la conversion des acides aminés en glucose et glycogène. Le mécanisme par lequel le cortisol diminue l'utilisation du glucose par les cellules n'est en revanche pas connu. En conséquence de ces effets, un excès de cortisol augmente le glucose sanguin et diminue la sensibilité à l'insuline, alors qu'un déficit en cortisol prédispose à l'hypoglycémie.

### c) Actions sur le métabolisme protidique

Le cortisol diminue l'utilisation des acides aminés pour la synthèse protéique à tous les niveaux sauf hépatique. Les réserves protéiques extrahépatiques sont diminuées et le taux d'acides aminés, dans le sang circulant, augmenté. Sous l'action du cortisol, l'utilisation extrahépatique des acides aminés décroît car ils ne sont plus incorporés dans cellules musculaires, d'où une réduction de la synthèse protéique. La poursuite de la protéolyse cellulaire entraîne une augmentation supplémentaire des acides aminés plasmatiques. Au niveau du foie, les taux plus élevés des acides aminés plasmatiques entraînent une amplification de leur incorporation dans les hépatocytes où ils sont utilisés pour la néoglucogenèse, la formation de glycogène et la synthèse des protéines.
Lors d'un déficit en cortisol, on n'observe pas d'augmentation mesurable de la synthèse protéique. En revanche, l'excès de cortisol est associé à une perte protéique progressive, une atrophie et une faiblesse musculaire, un amincissement de la peau et une perte de la matrice des os. La formation osseuse est réduite, le calcium est moins absorbé et plus excrété dans les urines.

### d) Actions sur le métabolisme des graisses

Le cortisol augmente également la mobilisation des acides gras et du glycérol à partir du tissu adipeux, augmentant leurs concentrations sanguines et rendant le glycérol plus disponible pour la gluconéogenèse.
Les actions du cortisol sur le métabolisme lipidique ne sont pas exclusivement lipolytiques. Le cortisol provoque une redistribution des graisses qui disparaissent des membres pour aller s'accumuler au niveau de la face et du tronc. Le mécanisme responsable de cette redistribution corporelle des lipides n'est pas connu.
Les différents effets du cortisol sur le métabolisme intermédiaire contribuent donc au maintien du glucose sanguin en l'absence d'apport alimentaire ou lorsque la consommation est accrue à la suite d'un stress. Mais ces effets protecteurs se font au détriment des protéines et des lipides.

### e) Actions sur le système circulatoire

Le cortisol est nécessaire au maintien de l'intégrité et de la réponse normale du système vasculaire, ainsi que du volume liquidien corporel.
En l'absence de cortisol, une vasodilatation anormale se produit si bien que, même sans perte liquidienne, le remplissage du lit vasculaire est réduit et la pression sanguine chute. De plus, la fonction rénale normale nécessite du cortisol. En son absence, la filtration glomérulaire diminue et l'eau n'est plus excrétée assez rapidement. Le cortisol possède également un effet minéralocorticoïde responsable en partie de la rétention du sodium et de l'excrétion du potassium. Bien que l'effet

minéralocorticoïde de l'aldostérone soit trois cents à six cents fois plus important que celui du cortisol, l'organisme sécrète, dans des circonstances normales, deux cents fois plus de cortisol que d'aldostérone. Il en résulte qu'une part substantielle de l'activité minéralocorticoïde globale provient du cortisol. Naturellement, lorsque la masse liquidienne corporelle ou la pression sanguine sont abaissées, le système rénine-angiotensine s'active pour stimuler la sécrétion d'aldostérone et non de cortisol car lorsque l'organisme a un besoin immédiat de minéralocorticoïdes, c'est l'aldostérone et non le cortisol qui remplit cette fonction.

### f) Actions dans les réactions inflammatoires et immunitaires

Les réactions de l'organisme contre les substances étrangères ou les blessures font intervenir de multiples réponses immunitaires et inflammatoires. Le cortisol, d'une façon globale, bloque ces réponses. Ces effets peuvent être bénéfiques dans la mesure où ils réduisent la lésion et la tuméfaction tissulaires et accélèrent la résolution de la réaction inflammatoire et le processus de cicatrisation. Mais ils peuvent s'avérer néfastes si ces réactions de défense de l'organisme sont trop détériorées.
Le cortisol exerce ces actions par plusieurs types de mécanismes :

- stabilisation des membranes des lysosomes, si bien que les enzymes protéolytiques ne sont plus libérées ;
- diminution de la perméabilité des capillaires, d'où un moindre passage du plasma et des cellules vers les zones inflammées ;
- dépression de la phagocytose des leucocytes ;
- suppression de certaines populations de lymphocytes d'origine thymique.

Le concept que la fonction essentielle du cortisol est une protection contre les réactions normales de l'organisme au stress suggère que quelques-unes des enzymes dont la synthèse est induite par le cortisol pourraient détoxifier l'organisme de médiateurs libérés à la suite de la réponse au stress.
La plupart des effets anti-inflammatoires ne sont retrouvés que pour de fortes doses de cortisol. De nombreux analogues du cortisol ont été synthétisés et présentent un effet anti-inflammatoire beaucoup plus important. Ils sont largement utilisés en médecine dans de nombreuses maladies où se produit une réaction inflammatoire trop importante ou bien lorsqu'une réponse immunitaire doit être bloquée.

### g) Action sur le système nerveux central

En plus de son action physiologique de rétrocontrôle négatif sur la sécrétion hypophysaire d'ACTH, le cortisol est capable de moduler la perception et l'émotion. Cela est plutôt observé en pathologie : dans les insuffisances surrénaliennes, les sens du goût, de l'ouïe et de l'odorat sont accentués alors que dans les hypercortisolismes, des troubles psychiques sont fréquemment retrouvés, pouvant se traduire par des états maniaques ou confusionnels, mais plus souvent par un état dépressif.

### h) Actions sur le fœtus

Le cortisol est important pour la maturation de différents organes fœtaux et son rôle s'exerce également de façon permissive. Le cortisol intervient en particulier dans la maturation d'enzymes intestinales et dans plusieurs processus de la fonction pulmonaire, dont la synthèse d'un phospholipide nécessaire au maintien de la tension de surface alvéolaire.

## D. Minéralocorticoïdes

Le principal minéralocorticoïde est l'aldostérone qui est produite par la zone glomérulée externe de la surrénale. Sa sécrétion est essentiellement sous le contrôle de l'angiotensine et, à un degré moindre, de la kaliémie et de l'ACTH. En son absence, l'équilibre hydroélectrolytique de l'organisme est profondément altéré, quoique, si le cortisol est normalement présent, ce dernier soit capable d'exercer un effet minéralocorticoïde suffisant pour prévenir une déplétion liquidienne progressive.

### 1. Régulation de la sécrétion des minéralocorticoïdes

#### a) Le système rénine-angiotensine

Comme la principale fonction de l'aldostérone est de contrôler le volume liquidien corporel en augmentant la réabsorption du sodium par les reins, il est normal que le principal stimulus de la synthèse et de la sécrétion de l'aldostérone provienne des reins (*fig. 6*).

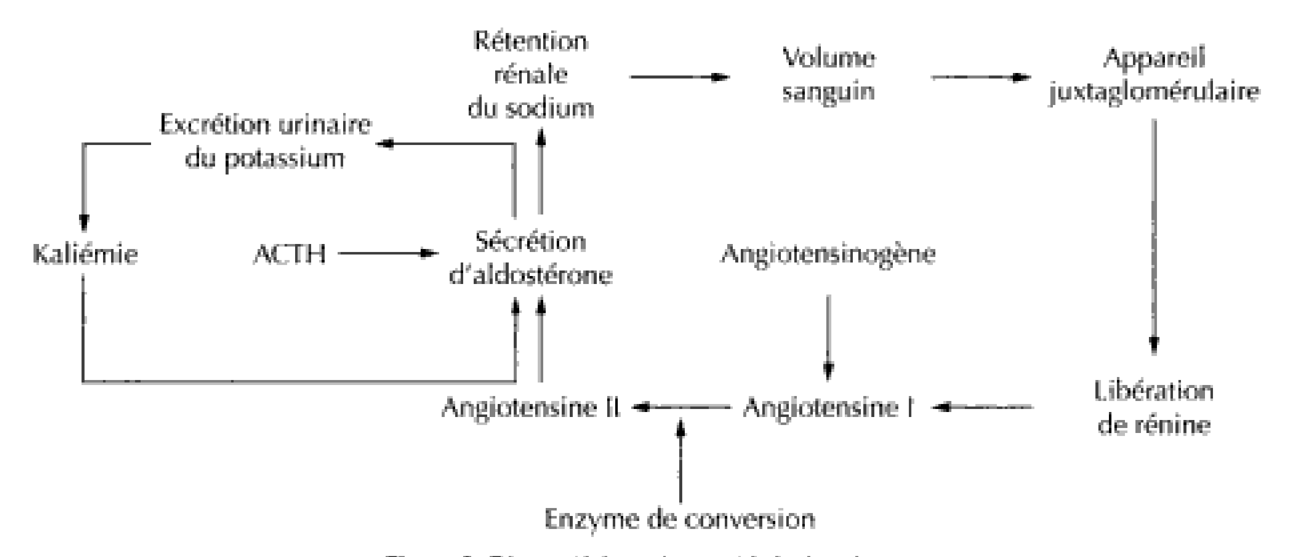



**Figure 6.** Biosynthèse des catécholamines

L'appareil juxtaglomérulaire se compose de cellules myoépithéliales modifiées situées au niveau des artérioles rénales afférentes et contiguës à la *macula densa* du tubule distal. Ces cellules synthétisent et sécrètent une enzyme protéolytique, la rénine, qui libère un peptide de dix acides aminés, l'angiotensine I, à partir de son substrat protéique, l'angiotensinogène. L'angiotensine I n'est pas active. Mais, sous l'action de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (enzyme retrouvée dans tout l'organisme et provenant des cellules endothéliales de la paroi des vaisseaux sanguins), elle est rapidement transformée en peptide de huit acides aminés très actif, l'angiotensine II.

L'angiotensine II exerce principalement deux actions : l'une directe comme vasoconstricteur artériolaire, l'autre comme agent stimulant de la sécrétion d'aldostérone. Ces deux actions, de concert, assurent le maintien de la pression et du volume vasculaire dans la circulation artérielle. Elles constituent le principal soutien au système vasculaire en cas de perte de liquide ou de chute de la pression sanguine.

### b) Stimuli libérant la rénine

Le principal stimulus déclenchant la libération de la rénine est une diminution de la pression sanguine au niveau des artérioles rénales afférentes, fonctionnant comme des barorécepteurs au niveau du système juxtaglomérulaire. Dès que se produit une chute soit du volume sanguin systémique, soit de la pression sanguine entraînant une diminution de la pression de perfusion rénale, la rénine est sécrétée. D'autres facteurs peuvent également stimuler la sécrétion de rénine. Il s'agit notamment de la concentration en sodium et en potassium au niveau de la *macula densa*, de la concentration plasmatique en électrolytes et de la concentration en angiotensine II circulante par un rétrocontrôle court. Certains de ces facteurs agissent en stimulant les nerfs sympathiques rénaux qui innervent l'appareil juxtaglomérulaire.

### c) Autres stimuli de la sécrétion d'aldostérone

Toutes les actions de la rénine se font par l'intermédiaire de la production d'angiotensine II qui est le principal stimulus de la synthèse d'aldostérone. La stimulation se produit à différents niveaux de la voie de synthèse.
Le taux plasmatique de potassium et l'ACTH stimulent également l'aldostérone. Il apparaît normal que le potassium agisse puisque l'un des principaux effets de l'aldostérone est d'augmenter l'excrétion rénale du potassium. Lorsque la kaliémie augmente brutalement, comme après un repas contenant des aliments riches en potassium, la sécrétion d'aldostérone est stimulée, agissant ainsi sur les reins pour éliminer la charge potassique excessive. Cependant, les effets de l'aldostérone sur le rein pour augmenter la rétention de sodium et l'excrétion de potassium ne se produisent qu'après au moins une heure. Il existe donc d'autres phénomènes plus rapides permettant d'éliminer une entrée potassique massive dans la circulation puisque des taux plasmatiques élevés de potassium peuvent être responsables de troubles graves. L'un d'eux fait intervenir le transfert rapide du potassium du milieu extracellulaire dans les cellules grâce aux effets combinés de l'insuline et de l'adrénaline sur le transport potassique à travers les membranes cellulaires.
L'action de l'ACTH sur la sécrétion d'aldostérone est puissante mais brève. Bien que le rôle physiologique de l'ACTH sur la production d'aldostérone soit limité, la zone glomérulée des surrénales s'atrophie lors des déficits en ACTH et devient moins apte à répondre aux autres stimuli.

### d) Sécrétion physiologique de l'aldostérone

L'aldostérone est un minéralocorticoïde si actif que ses effets se produisent pour de très petites quantités d'hormone. Seuls 50 à 200 mg d'aldostérone sont normalement produits chaque jour par l'organisme. Comme il n'existe pas de protéine plasmatique liant spécifiquement ce stéroïde, il y a très peu d'aldostérone circulante liée. Les concentrations plasmatiques sont d'environ 100 pg/ml. La sécrétion peut être augmentée de deux à six fois par une déplétion sodée ou même plus encore lors d'une diminution persistante du volume sanguin artériel comme dans la cirrhose du foie avec ascite et œdèmes importants.

### c) Métabolisme de l'aldostérone

L'aldostérone est métabolisée principalement dans le foie en un dérivé tétrahydrogéné qui est excrété dans l'urine sous forme de glucuronide. Une partie de l'aldostérone est excrétée non métabolisée et également sous forme de glucuronide. Cette fraction est labile en milieu acide, représente à peu près 10 % de la sécrétion totale et correspond à la fraction habituellement mesurée. La sécrétion urinaire normale d'aldostérone varie de 5 à 20 μg/jour.

## 2. Fonctions des minéralocorticoïdes

### a) Réabsorption rénale du sodium

L'action principale de l'aldostérone consiste à augmenter la réabsorption du sodium au niveau des tubules distaux. Pour ce faire, elle se lie tout d'abord à des récepteurs cytosoliques, puis les complexes hormones-récepteurs sont transférés dans le noyau où ils induisent, au niveau de portions spécifiques d'ADN, la formation d'ARN messagers qui, à leur tour, augmentent la synthèse d'enzymes intervenant dans le transport transmembranaire du sodium. L'ensemble de ces processus se déroule en trente à soixante minutes, période donc nécessaire pour que les effets de l'aldostérone soient détectables.

Comme l'aldostérone augmente la réabsorption active du sodium, un gradient électrochimique s'établit, facilitant le transfert passif du potassium des cellules tubulaires vers l'urine. Il en résulte que l'excrétion du potassium n'est pas un échange direct avec le sodium mais se fait d'une façon qui dépend directement de la réabsorption active du sodium. Si tout le sodium est déjà réabsorbé au niveau des tubules proximaux comme c'est le cas dans les hypovolémies sévères, seule une faible fraction pourra parvenir sur les sites de réabsorption distaux. Il en résulte alors, malgré des taux élevés d'aldostérone, que l'excrétion potassique sera minimale en l'absence d'approvisionnement en sodium des tubules distaux. D'autre part, un régime riche en sodium entraînera une augmentation de l'excrétion potassique. Cela est particulièrement vrai si le sujet reçoit un diurétique qui bloque en partie la réabsorption tubulaire du sodium, entraînant une augmentation de la concentration en sodium au niveau des sites de réabsorption distaux.

Lorsque le sodium est réabsorbé au niveau du rein, une quantité équivalente d'eau est également réabsorbée, assurant ainsi une concentration normale de sodium dans le liquide extracellulaire. Si la quantité d'eau réabsorbée n'est pas suffisante, la concentration en sodium s'élève et l'augmentation de la pression osmotique déclenche la sécrétion d'hormone antidiurétique qui va augmenter, d'une part, la réabsorption rénale de l'eau et, d'autre part, la prise de liquide en stimulant la sensation de soif.

### b) Phénomène d'échappement

Dans des conditions usuelles de faible déplétion sodée conduisant à une augmentation de la sécrétion d'aldostérone, le volume liquidien extracellulaire s'accroît au fur et à mesure que le sodium est réabsorbé. Lorsque l'augmentation de volume est suffisante pour supplémenter la diminution qui a déclenché le phénomène, le mécanisme s'arrête. Dans certains cas, comme lors d'une fuite persistante de

liquide dans l'abdomen observée chez les patients atteints de cirrhose hépatique avec ascite, la stimulation de la sécrétion d'aldostérone ne s'arrête jamais. Le sodium et l'eau réabsorbés ne compensent pas l'hypovolémie circulante à cause de la fuite continuelle. Cela explique les taux d'aldostérone très élevés, ou hyperaldostéronismes secondaires, retrouvés dans les états œdémateux chroniques. Lorsque la fuite n'est pas continue mais que les taux d'aldostérone restent élevés, comme dans les tumeurs sécrétant de l'aldostérone, le volume extracellulaire augmente de quelques litres puis l'expansion s'arrête. Ce phénomène d'échappement résulte probablement de la somme de plusieurs effets :

- diminution de la réabsorption proximale du sodium causée vraisemblablement par un facteur natriurétique d'origine hypothalamique ;
- augmentation de la filtration glomérulaire résultant peut-être de l'action du facteur atrial natriurétique ;
- diminution des taux de rénine et d'angiotensine à la suite de l'augmentation de la pression sanguine systémique, de la pression de perfusion rénale et du contenu en sodium de *la macula densa*.

Bien que la réabsorption de sodium soit ralentie, l'excrétion du potassium continue car l'approvisionnement en sodium est toujours élevé au niveau du tubule distal.

### 3. Effets extrarénaux des minéralocorticoïdes

L'aldostérone augmente également la réabsorption du sodium à tous les niveaux où il peut être excrété : salive, sueur, fèces. Lorsqu'une activité physique est réalisée pour la première fois sous un climat chaud, une quantité importante de sodium peut être perdue à la suite d'une forte sudation. La perte de liquide qui en résulte active le système rénine-angiotensine-aldostérone entraînant une rétention sodée de plus en plus importante. Ce processus d'acclimatation à un environnement chaud va conduire au bout de quelques jours à une sueur dépourvue de sodium. Il n'est donc pas nécessaire d'augmenter l'apport sodé au-delà de celui que fournissent les aliments lors d'exercices physiques continus sous climat chaud, seul suffit un apport hydrique adéquat pour compenser la perte sudorale.

## E. Androgènes surrénaliens

Le troisième groupe de stéroïdes sécrétés par la corticosurrénale est constitué par les androgènes, stéroïdes à 19 atomes de carbone qui, contrairement aux deux autres groupes, n'apparaissent pas indispensables à la vie mais contribuent au développement d'un certain nombre de caractères sexuels. Les deux androgènes principaux sécrétés par la corticosurrénale sont la déhydroépiandrostérone et son sulfate. Deux autres sont sécrétés en quantité plus faible : la 4-androstènedione et la testostérone. Ils sont formés principalement au niveau de la zone réticulée, surtout à la suite de l'action de l'ACTH mais certainement et aussi en réponse à la prolactine. Leur sécrétion normale chez l'adulte est épisodique et se fait en synchronisation avec celle du cortisol. Les androgènes sont sécrétés en faible quantité durant l'enfance, mais leur production augmente au moment de l'adolescence en association avec les premiers signes de la maturation sexuelle. Cet épisode est appelé « adrénarche ».

L'androgène physiologiquement le plus actif est la testostérone ainsi que son métabolite 5 α-réduit, la dihydrotestostérone (DHT). Ces deux hormones agissent sur la libido et la pousse des poils pubiens et axillaires chez les deux sexes. Les autres androgènes surrénaliens ont une action moins puissante et sont considérés comme des androgènes faibles. Ils peuvent cependant être convertis en testostérone au niveau des tissus périphériques et sont donc, au sens strict du terme, plutôt des précurseurs que des androgènes. Chez l'homme, la testostérone provient en grande partie des testicules. Chez la femme, où les taux circulants de testostérone sont dix à quinze fois plus faibles, la testostérone provient essentiellement de la conversion périphérique de la Δ4-androstènedione produite par les ovaires et les surrénales. Chez la femme ménopausée dont les ovaires ne sont plus actifs, les androgènes surrénaliens sont à l'origine de la production des estrogènes par conversion périphérique.

## III. Physiologie de la médullosurrénale

Les catécholamines sont des hormones sécrétées par le système nerveux sympathique. Dans les nerfs périphériques, le neurotransmetteur localement produit et sécrété est la noradrénaline, alors que dans la médullosurrénale, la principale sécrétion est l'adrénaline. La noradrénaline peut être considérée plutôt comme une hormone agissant localement, impliquée dans la transmission nerveuse et ne passant dans la circulation générale qu'après une activation intense du système nerveux sympathique. En revanche, l'adrénaline est libérée de la médullosurrénale en réponse à un stress puis circule à travers l'organisme pour le préparer à ses réactions de défense. Les effets de l'activité nerveuse adrénergique se font par l'intermédiaire de récepteurs α et β situés dans les tissus effecteurs. Ces récepteurs ont souvent une action antagoniste comme l'α-vasoconstriction et la β-vasodilatation.

### A. Synthèse et sécrétion de l'adrénaline

La médullosurrénale est un ganglion sympathique modifié formé de cellules postganglionnaires sans axone, spécialisé dans la sécrétion des catécholamines par l'intermédiaire des cellules chromaffines (cellules fixant le chrome). Une fibre préganglionnaire provenant du nerf splanchnique innerve un grand nombre de cellules médullaires, si bien que seules quelques impulsions peuvent provoquer une décharge massive de catécholamines.
L'adrénaline est synthétisée dans la médullosurrénale (et certainement dans un certain nombre de neurones cérébraux) à partir de la noradrénaline par l'action d'une enzyme, la phénylethanolamine-N-méthyltransférase ou PNMT (*fig. 7*).
La synthèse de la PNMT est induite par le cortisol. Comme la médullosurrénale est entourée par le cortex surrénalien, elle est soumise à de très fortes concentrations de cortisol si bien que de fortes quantités de PNMT sont disponibles. À peu près 80 % de la sécrétion en catécholamines de la médullosurrénale sont constitués par de l'adrénaline, le reste étant de la noradrénaline. Le facteur limitant de la synthèse des catécholamines est le taux de tyrosine hydroxylase, enzyme assurant

$NH_2$
$CH_2-CH-COOH$
HO
Tyrosine
Tyrosine hydroxylase
$NH_2$
HO
$CH_2-CH-COOH$
HO
Dihydroxyphénylalanine (Dopa)
Dopa décarboxylase
HO
$CH_2-CH_2-NH_2$
HO
Dopamine
Dopamine ß-hydroxylase
OH
HO
$CHCH_2-NH_2$
HO
Noradrénaline
Phényléthanolamine N-Métyltransférase
OH
HO
$CHCH_2-NHCH_3$
HO
Adrénaline

**Figure 7.** Biosynthèse des catécholamines

l'hydroxylation de la tyrosine en dihydroxyphénylalanine ou DOPA. La tyrosine hydroxylase est inhibée allostériquement par la noradrénaline. Lorsque, d'une façon aiguë, l'activité neuronale provoque une libération des catécholamines cytoplasmiques, l'enzyme est libérée de l'inhibition provoquée par les produits terminaux. Lors d'une stimulation chronique, une quantité plus importante d'enzyme est synthétisée. La libération des catécholamines se produit grâce à une association stimulus-sécrétion :

- des impulsions nerveuses préganglionnaires libèrent de l'acétylcholine ;
- l'acétylcholine augmente la perméabilité membranaire et dépolarise la membrane cellulaire ;
- la pénétration du calcium est ainsi augmentée ;
- une exocytose des granules sécrétoires est alors déclenchée.

## B. Devenir des catécholamines sécrétées

Les catécholamines sont rapidement éliminées des synapses et de la circulation par différents processus :

- recapture par les cellules sécrétant les catécholamines pour réutilisation ou métabolisme ;
- fixation par les récepteurs des cellules effectrices ;

- inactivation, principalement au niveau du foie, par l'intermédiaire de deux enzymes : la catéchol O-méthyltransférase et la monoamine oxydase (*fig.* 8). Les produits de ce métabolisme sont principalement excrétés par le rein sous forme de métanéphrines et d'acide vanylmandélique (VMA).

Noradrénaline → Adrénaline

Noradrénaline —COMT→ Normétanéphrine ; Adrénaline —COMT→ Métanéphrine

Noradrénaline, Adrénaline —MAO→ DOMA

Normétanéphrine —MAO→ Acide vanylmandélique ; Métanéphrine —MAO→ Acide vanylmandélique ; DOMA → Acide vanylmandélique

DOMA : acide 3,4-dihydroxymandélique ; MAO : monoamine oxydase ;
COMT : catéchol O-méthyl-transférase

**Figure 8.** Métabolismes des catécholamines

## C. Actions de l'adrénaline

Les récepteurs α et β des catécholamines sont présents dans de nombreux tissus. L'adrénaline et la noradrénaline peuvent réagir avec les deux types de récepteur α- et β-adrénergiques, si bien que la réponse d'un système donné à une stimulation dépendra de la prédominance du type de récepteurs adrénergiques présents dans ce système (*tab. 3*).

Comme la médullosurrénale intervient pour seulement 10 % dans l'activation nerveuse sympathique, il est tout à fait possible de survivre sans cette glande.

Les actions principales de l'adrénaline sont les suivantes :

- *réactions d'éveil* : dilatation des pupilles, piloérection, sudation, dilatation bronchique, tachycardie, inhibition de la musculature lisse du tractus gastro-intestinal, constriction des sphincters, relaxation des muscles utérins ;
- *métaboliques* : l'adrénaline provoque un apport accru de glucose et d'acides gras libres. Cela se produit en stimulant la gluconéogenèse et en libérant le glucose du glycogène (glycogénolyse) par activation des phosphorylases hépatique et

musculaire. L'adrénaline entraîne une lipolyse au niveau des adipocytes en activant la lipase qui transforme les triglycérides en acides gras libres et en glycérol. Le résultat global de ces effets calorigènes permet d'augmenter le taux de métabolisme de 20 à 30 % ;

- *cardio-vasculaires* : en plus de ses effets vasoconstricteurs et stimulants du rythme cardiaque, l'adrénaline libérée de façon répétée est responsable d'une hypertension permanente par la combinaison de plusieurs effets (vasoconstriction, stimulation du système rénine-angiotensine).

L'ensemble des effets de l'adrénaline va donc permettre à l'organisme de réagir rapidement et d'augmenter son activité face à une situation de stress ou d'agression.

**Tableau 3.** Actions des catécholamines

| Actions médiées par les récepteurs α (noradrénaline > adrénaline) | Actions médiées par les récepteurs β (adrénaline > noradrénaline) |
|---|---|
| ↑ Néoglucogenèse | ↑ Glycogénolyse |
| ↑ Sécrétion d'insuline | ↑ Lipolyse et cétogenèse |
| | ↓ Utilisation du glucose |
| | ↑ Sécrétion d'insuline |
| | ↑ Sécrétion de glucagon |
| | ↑ Pénétration musculaire de K |
| ↓ Contraction des artérioles (rein, peau, sphère génitale) | ↑ Dilatation des artérioles musculaires |
| | ↑ Contraction cardiaque (β1) |
| | ↑ Rythme cardiaque (β1) |
| | ↑ Vitesse de conduction cardiaque (β1) |
| ↑ Contraction des sphincters (gastro-intestinal, urinaire) | ↑ Relâchement musculaire (gastro-intestinal, urinaire, bronchique) (β2) |
| Sudation | |
| Dilatation des pupilles | |
| ↑ Sécrétion d'hormone de croissance | ↑ Sécrétion de rénine |
| | ↑ Sécrétion de parathormone (PTH) |
| | ↑ Sécrétion des hormones thyroïdiennes |

***Pour en savoir plus***


- Wilson J. D., Foster D. W. *Williams textbook of endocrinology*, 7e éd. W. B. Saunders Company, Philadelphie (États-Unis), 1985.
- Norman A. W. Litwack G. Hormones, Academic Press, San Diego (États-Unis), 1987.
- Griffin J. E. Ojeda S. R. *Textbook of endocrine physiology*, Oxford University Press, New York (États-Unis), 1988.

# Physiologie de la thyroïde

M.-L. PIKETTY, L. KRAOUL, K. TABAOUTI
Laboratoire de biologie, Centre hospitalier Sainte-Anne, Paris.

*Le goitre, augmentation de volume de la glande thyroïde, est connu depuis l'Antiquité. L'iode en revanche est un élément qui n'a été isolé et identifié par le chimiste Bernard Courtois qu'au début du XIXe siècle (1812) : en brûlant du sel de mer et du varech, il observait une flamme violette, qui ne correspondait à aucun élément connu. Ce nouvel élément a été isolé et appelé « iode » (du grec iodes, violet). C'est Jean-François Coindet, un médecin genevois, qui eut l'idée d'en administrer à ses patients atteints de crétinisme endémique vers 1820. La T4 a été isolée par Kendall en 1919. La deuxième hormone, la T3, n'a été découverte qu'en 1952.*

# I. Anatomie

La glande thyroïde est située en avant de la trachée à la face antérieure du cou : c'est une glande superficielle, accessible à la palpation. Elle est formée de deux lobes latéraux verticaux réunis par un isthme, lui donnant la forme d'un papillon. Les lobes thyroïdiens mesurent entre 4 et 6 cm de hauteur, et entre 2 et 3 cm de largeur. Le poids d'une thyroïde normale est de l'ordre de 10 à 20 g (environ 16 $cm^3$). Quelques-uns des rapports anatomiques de la glande sont importants en raison de leur implication clinique : les quatre glandes parathyroïdes (situées sur la face postérieure des lobes latéraux), ainsi que les nerfs récurrents, innervant le larynx, qui doivent être respectés lors d'une chirurgie. En plus d'une vascularisation sanguine développée, plusieurs vaisseaux lymphatiques la traversent, le drainage lymphatique est assuré par de nombreux ganglions.

# II. Histologie

L'unité de base anatomique et fonctionnelle est le follicule thyroïdien (*fig. 1*). Le tissu thyroïdien est constitué de ces follicules. Ces structures de base sont des sphères creuses d'un diamètre compris entre 200 et 300 µm, constituées d'une seule assise de cellules folliculaires jointives, les thyréocytes, entourant une cavité centrale, remplie de colloïde. Chaque thyréocyte a deux pôles : le pôle basal, où se situent les échanges avec les capillaires sanguins, et le pôle apical, en contact avec la colloïde. La membrane plasmique apicale est hérissée de microvillosités ou pseudopodes. Les thyréocytes présentent les caractéristiques des cellules sécrétoires, avec un réticulum endoplasmique rugueux, un appareil de Golgi développé d'où sont issues les vésicules d'exocytose (contenant la thyroglobuline et migrant vers la lumière folliculaire), des vésicules d'endocytose qui résultent de la phagocytose de la colloïde par les cellules, et des lysosomes. La glande est entourée d'une capsule fibreuse.
La glande thyroïde contient aussi des cellules claires, ou cellules C, dispersées dans le parenchyme périfolliculaire, concentrées dans le tiers moyen de chaque lobe. Ces cellules sont responsables de la synthèse et de la sécrétion de la thyrocalcitonine, hormone polypeptidique non iodée. Cette hormone intervient dans

l'homéostasie calcique et la régulation des cellules osseuses. Sa synthèse est régulée par la concentration en calcium ionisé. Son action se situe au niveau osseux (diminution de l'activité des ostéoclastes), au niveau intestinal (diminution de l'absorption du calcium), et rénal (diminution de la réabsorption tubulaire du calcium). Elle est hypocalcémiante, hypophosphorémiante et natriurétique.

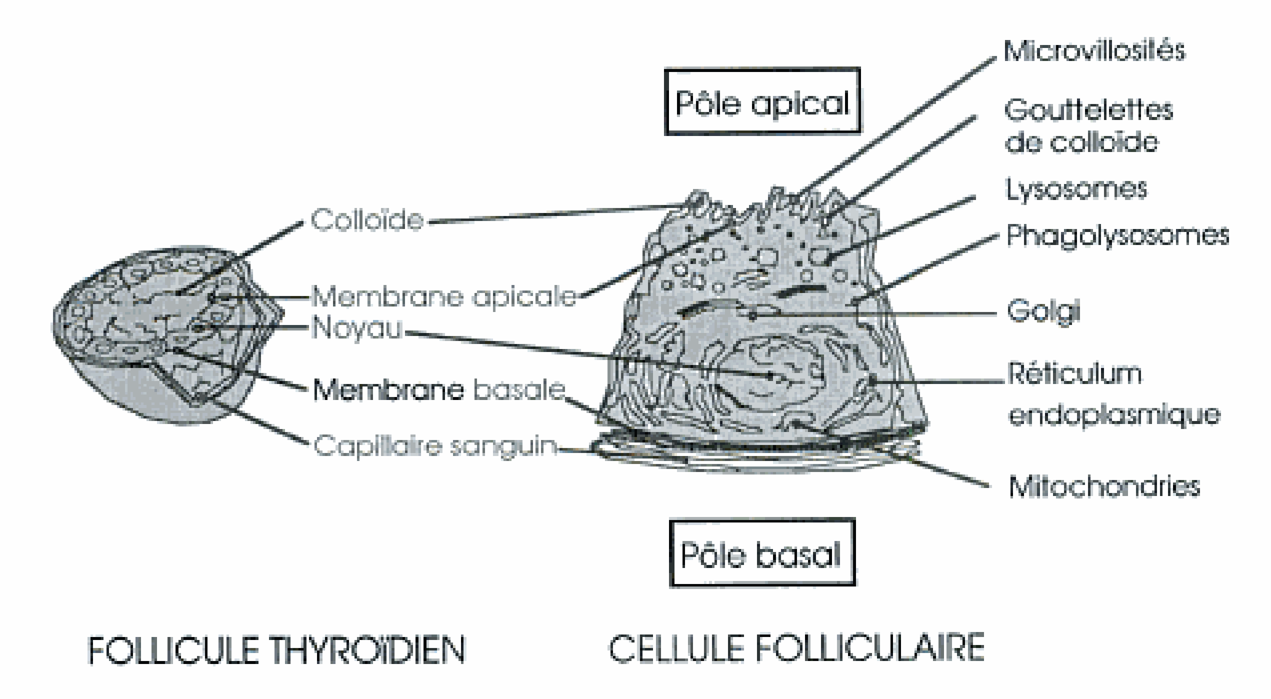



**Figure 1.** Histologie. Le follicule thyroïdien et la cellule folliculaire

## III. Embryologie

Chez l'embryon, la différenciation fonctionnelle de la glande s'effectue au cours du troisième mois. L'embryogenèse des noyaux hypothalamiques, des cellules hypophysaires thyréotropes et des cellules folliculaires thyroïdiennes est terminée à douze semaines de gestation, mais leur maturation fonctionnelle se poursuit jusqu'à la période néonatale. Dès que les follicules thyroïdiens apparaissent, la glande acquiert le pouvoir de concentrer les iodures qui passent librement la barrière placentaire. La sécrétion des hormones thyroïdiennes apparaît dès la vingtième semaine.
Il existe un passage placentaire des hormones thyroïdiennes de la mère, qui pendant les premiers mois de la grossesse est la source unique d'hormones pour le fœtus.

## IV. Biosynthèse des hormones thyroïdiennes

Le fonctionnement de la glande thyroïde et la production d'hormones thyroïdiennes dépendent de l'apport alimentaire en ion iodure $I^-$. Les vertébrés ont développé un système de captage de l'iodure qui permet à la glande de concentrer cet

élément rare. La biosynthèse des hormones thyroïdiennes fait appel à plusieurs constituants essentiels de la glande : le transporteur de l'iodure, la thyroglobuline (Tg), la thyroperoxydase (TPO), et le système produisant $H_2O_2$.

## A. Apport et métabolisme de l'iode

L'iode est apporté par l'alimentation sous forme d'iode organique, lui-même réduit en iodure dans l'estomac. L'absorption intestinale est très efficace et seule une infime quantité d'iodure est éliminée par voie fécale. L'apport quotidien de cet oligo-élément est très variable selon les pays et les régions. Dans le monde, les régions d'endémie goitreuse font l'objet de programmes de l'OMS utilisant des injections d'huile iodée et l'administration de sel iodé. Les besoins en iode de l'organisme sont évalués entre 150 et 200 µg par jour. En France, cet apport est en moyenne de 75 à 200 µg par jour. L'iodurie est égale aux apports alimentaires, car l'excrétion est quasi exclusivement rénale. La clairance rénale de l'iodure est de 30 à 40 ml/min, avec une réabsorption passive par le tubule. Le reste de l'iode est capté par la thyroïde par un mécanisme actif. D'autres tissus sont capables de fixer l'iode : les glandes salivaires, la muqueuse gastrique, les plexus choroïdes, le placenta et la glande mammaire. Les différentes étapes de la synthèse sont :

- la captation des iodures ;
- l'oxydation puis la fixation de l'iode sur des résidus tyrosines de la Tg, grâce à la TPO et à $H_2O_2$, permettant la formation de mono- et de diiodotyrosines (MIT et DIT). Cette étape est souvent appelée « organification de l'iode » (*fig.* 2) ;
- le couplage des résidus d'iodotyrosines en iodothyronines – triiodothyronine = T3 et tétraiodothyronine ou thyroxine = T4 – (*fig.* 2), également catalysé par la TPO, sur la molécule de Tg. Les formes actives des hormones sont les formes lévogyres ;
- la pinocytose de gouttelettes de colloïde ;
- la protéolyse de la Tg et la libération des hormones T4 et T3, ainsi que MIT et DIT ;
- le recyclage intrathyroïdien de l'iode : les deux précurseurs MIT et DIT sont désiodés et l'iode libéré est recyclé.

## B. Captation des iodures par les thyréocytes

La glande thyroïde humaine normale contient environ 10 mg d'iode. Le transport de l'iode est une étape cruciale et limitante de la biosynthèse des hormones. Au niveau du pôle basal des thyréocytes se trouvent le réseau capillaire et le système de transport actif de l'iodure appelé « transporteur sodium-iodure » ou « symporteur » (*fig.* 3). L'iodure est ainsi concentré d'un facteur 100 dans le thyréocyte. La clairance thyroïdienne de l'iode est adaptative. Elle baisse lorsque l'iodurémie augmente et vice-versa, pour maintenir stable la quantité d'iodures apportée à la glande. D'autres ions de même charge, comme le perchlorate et le pertechnétate peuvent être captés. Le thiocyanate s'oppose de façon compétitive au transport de l'iodure (l'alimentation à base de choux des habitants des Alpes majorait leur carence iodée, car le chou est riche en thiocyanate. Le pertechnétate radioactif est utilisé pour visualiser la glande en scintigraphie. Le perchlorate était utilisé dans les épreuves dynamiques de « chasse des iodures »).

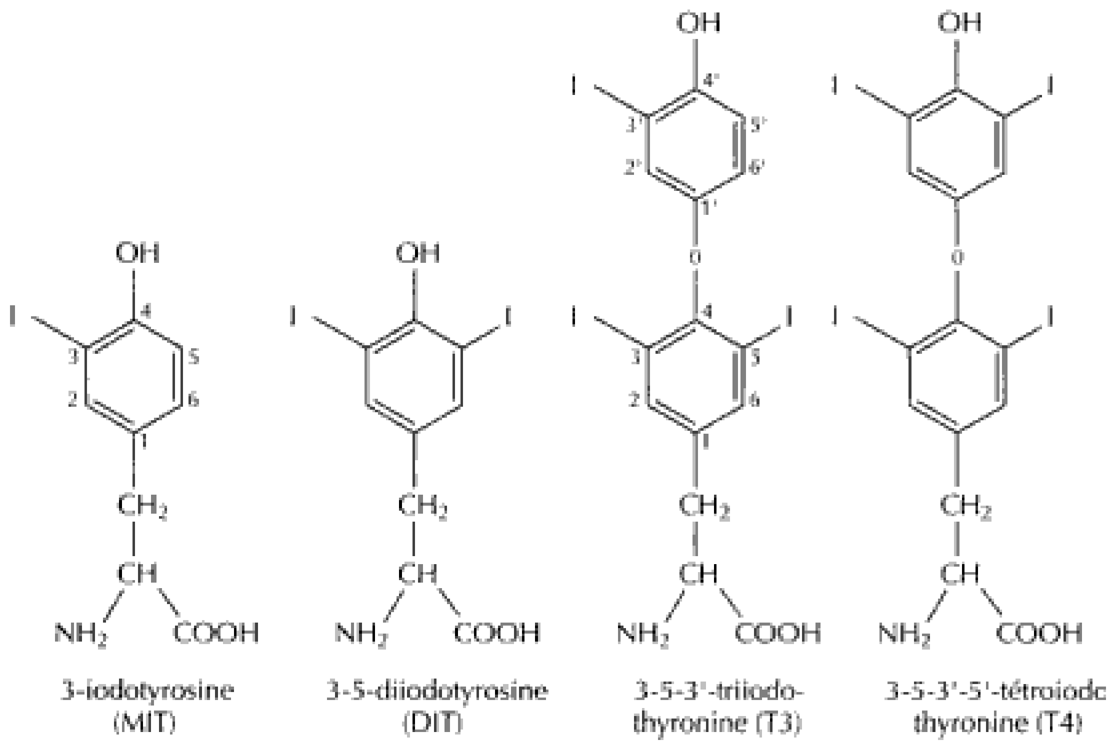



**Figure 2.** Structure des précurseurs iodotyrosines (MIT, DIT) et des hormones T3 et T4

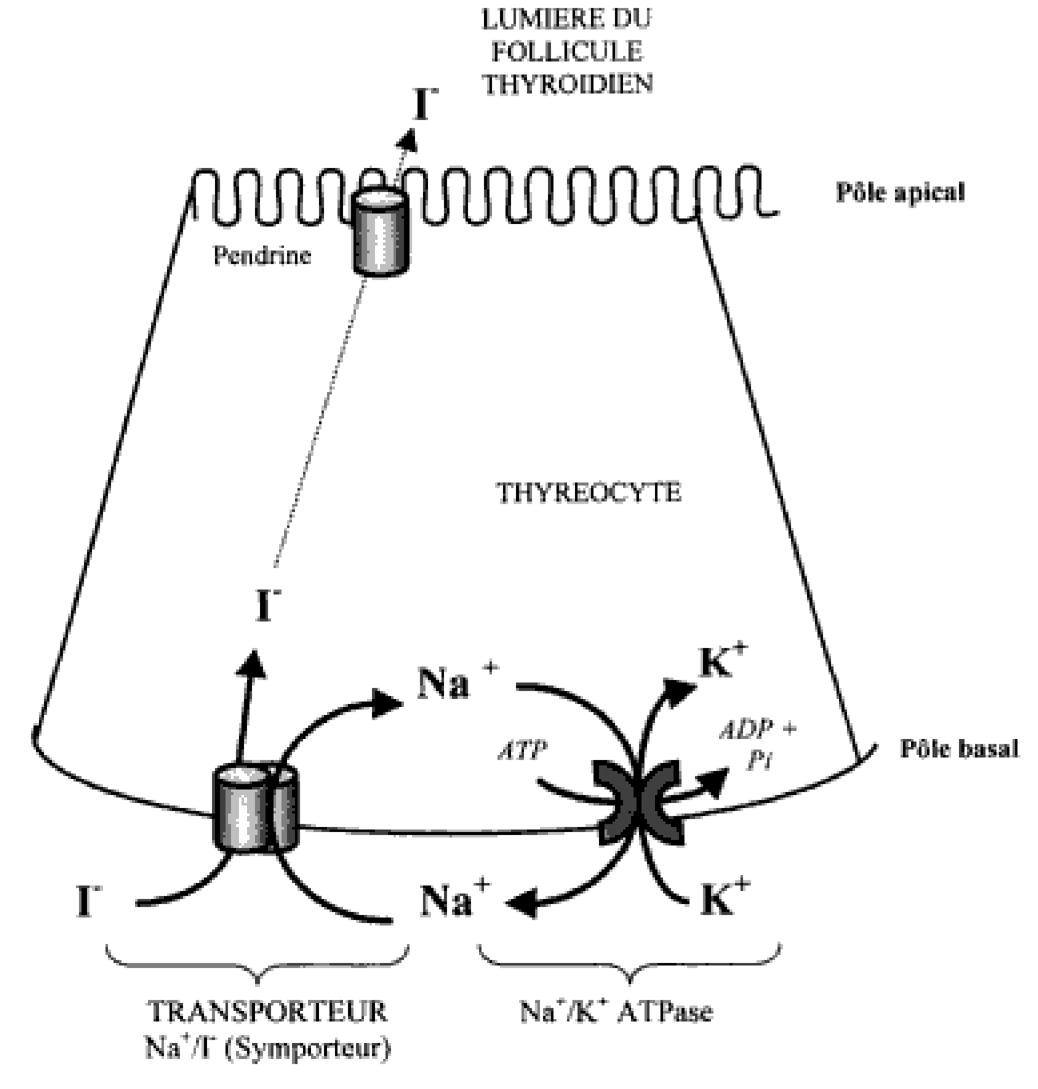



**Figure 3.** Le système de transport de l'iodure

Le système de transport des iodures nécessite de l'énergie, il est bloqué par les inhibiteurs métaboliques. L'entrée de l'ion iodure requiert de l'énergie car elle s'opère contre un gradient de concentration et contre un gradient électrique. Elle demande la présence et le transport d'ions $Na^+$. Le gradient de concentration de $Na^+$, qui est en revanche favorable, agit comme la force motrice pour le transport de l'iodure. Donc le fonctionnement du transporteur $Na^+$-$I^-$ requiert le maintien du gradient de concentration des ions $Na^+$. Cela est possible grâce à la $Na^+$-$K^+$-ATPase qui expulse les ions $Na^+$ et en même temps assure l'entrée d'ions $K^+$ (*fig. 3*). Le système de transport de l'iode est saturable. La synthèse et l'activité du transporteur sont contrôlées par la TSH. Le transfert intrathyroïdien de l'iodure dépend donc de l'hormone thyréotrope (TSH) et est modulé par la teneur en iode de la glande thyroïde. L'iodure une fois entré dans la cellule migre très rapidement vers le pôle apical, où il passe dans le colloïde grâce à un transporteur qui pourrait être la pendrine.

## C. Synthèse de la thyroglobuline (Tg)

La Tg est une glycoprotéine spécifique majeure pour la glande thyroïde, elle est le support de la biosynthèse des hormones thyroïdiennes et leur forme de stockage dans la glande. Il s'agit d'une glycoprotéine iodée homodimérique (MM : 660 KDa) qui comporte deux sous-unités identiques, chacune de 2 800 aa. Le gène de la Tg est situé sur le chromosome 8. Les résidus tyrosines, à partir desquels va se faire la synthèse, ne représentent que 3 % des acides aminés et sont localisés à la surface de la molécule. La partie glucidique de la molécule représente 8 à 10 % de sa masse. La synthèse de la Tg s'effectue sur les polyribosomes associés aux membranes externes du réticulum endoplasmique, puis elle est transportée à travers l'appareil de Golgi vers les vésicules d'exocytose. La fusion de la membrane de ces vésicules avec la membrane apicale permet le passage de la Tg dans la lumière folliculaire.

## D. Oxydation des iodures et iodation de la Tg : organification de l'iode

(*fig. 4*)

L'iodation de la Tg nécessite la transformation de l'iodure en un radical libre, apparaissant en présence d'$H_2O_2$ et de la peroxydase thyroïdienne (TPO) selon la réaction :

$$2I^- + H_2O_2 \Rightarrow 2\,I^* + 2\,H_2O + O_2$$

L'iodation s'effectue sur les radicaux tyrosyls de la Tg, en position ortho du groupement OH, par substitution d'un atome d'hydrogène. La forme active de l'iode serait une forme radicalaire liée à la TPO. C'est une glycoprotéine possédant deux sites enzymatiques distincts : un nécessaire à l'oxydation de l'iodure, l'autre à celle du résidu tyrosyl de la Tg, accepteur de l'iode.
Les inhibiteurs les plus puissants de la TPO sont le cyanure, l'azide et le bisulfite. Moins toxiques, les thionamides ou antithyroïdiens de synthèse, comme le propylthiouracile et le methylmercapto-imidazole, sont utilisés en thérapeutique.
Le thyréocyte contient un système capable de produire des quantités suffisantes de $H_2O_2$ pour la synthèse des hormones et le stockage de l'iodure, tout en évitant la surproduction de cet oxydant puissant.

La fixation d'un atome d'iode sur un résidu tyrosyl conduit à la mono-3-iodotyrosine (MIT). Un second atome d'iode sur la MIT conduit à la di-3,5-iodotyrosine (DIT). Le site d'iodation de la Tg se situe au pôle apical et/ou dans la lumière folliculaire, au contact de la membrane apicale. L'iodation des résidus tyrosyls intervient très rapidement après l'entrée de l'iodure (quelques minutes), elle est activée par la TSH.

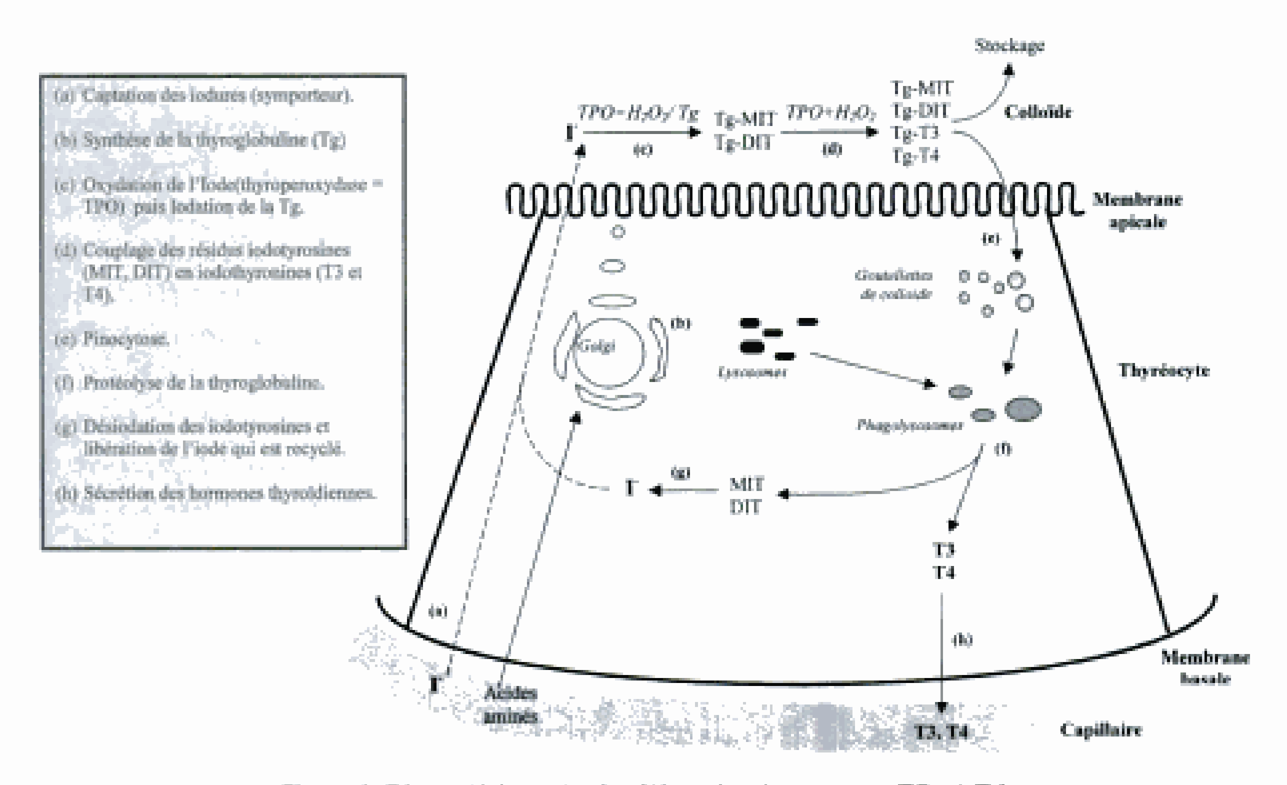



**Figure 4.** Biosynthèse et sécrétion des hormones T3 et T4

## E. Couplage des radicaux iodotyrosines *(fig. 4)*

Le couplage des précurseurs MIT et DIT se fait au sein de la molécule de Tg, à l'intérieur de la colloïde. Le couplage d'un MIT et d'un DIT donne la 3,5,3'-triiodothyronine (T3). Le couplage de deux DIT donne la 3,5,3',5'-tétraiodothyronine ou thyroxine (T4) *(fig. 2)*. Ces réactions de couplage nécessitent également l'action de la TPO et durent quelques heures.

La Tg contient 120 résidus tyrosyls, dont trente à quarante seulement peuvent être iodés, pour former MIT et DIT. Parmi ces iodotyrosines, seulement six à huit peuvent se coupler pour former trois ou quatre molécules de T3 et T4 par molécule de Tg. Il a récemment été montré que les résidus tyrosyls accepteurs de la Tg sont sulfatés et que cette sulfatation pourrait jouer un rôle dans la réaction de couplage, en intervenant dans l'interaction avec la TPO. La localisation des sites hormonogéniques est connue. Un de ces sites (tyr5) est situé à proximité de l'extrémité N-terminale et apparaît être le site préférentiel de formation de la T4. Un autre site (tyr2746) est situé à l'extrémité C-terminale et apparaît être le seul site formant la T3. Le nombre d'atomes d'iode incorporés dépend étroitement de l'apport alimentaire iodé. Les quantités de T3 et T4 formées sont fonction des quantités respectives de MIT et DIT. Dans les conditions optimales d'iodation, la Tg contient deux à cinq fois plus de T4 que de T3. En situation de carence iodée, le rapport MIT sur DIT augmente avec formation préférentielle de T3.

### F. Stockage, libération des hormones et sécrétion (*fig.* 4)

La Tg iodée présente dans la colloïde constitue la forme de mise en réserve des hormones thyroïdiennes. La thyroïde est la seule glande endocrine à posséder une importante réserve hormonale. Chez l'homme, les quantités de T4 et T3 présentes dans la Tg stockée dans les follicules correspondent à trente à soixante fois les besoins quotidiens.
Les pseudopodes du pôle apical enserrent du matériel colloïde qui, après fusion des membranes, se retrouve à l'intérieur de vésicules d'endocytose, dans le cytoplasme des thyréocytes. Peu après leur formation, les vésicules d'endocytose fusionnent avec les lysosomes pour former les phagolysosomes qui migrent vers la membrane basale. Au cours de cette migration, les protéases lysosomiales (endo- et exopeptidases) scindent la molécule de Tg et libèrent T3, T4, et les précurseurs MIT et DIT. La T3 et la T4 diffusent dans la circulation capillaire, de même qu'une infime quantité de Tg (à l'état physiologique).
Les composants membranaires impliqués dans l'endocytose sont recyclés dans l'exocytose (voir synthèse de la Tg). Les sels de lithium inhibent la protéolyse de la thyroglobuline. La TSH stimule l'activité pinocytaire des microvillosités, ainsi que l'activité lysosomiale.

### G. Recyclage intrathyroïdien de l'iode

T3 et T4 ne subissent pas de désiodation sur place. En revanche, les précurseurs iodotyrosines ne passent pas dans la circulation car ils sont immédiatement désiodés par la iodotyrosine désiodase microsomiale en tyrosine et iodure. L'iode ainsi libéré au pôle basal rejoint l'iode capté par le transporteur des iodures pour servir à nouveau de substrat d'iodation. Ce mécanisme d'économie de l'iode est fondamental, car il existe des hypothyroïdies congénitales dues à un déficit enzymatique de cette désiodase.

## V. Régulation de la biosynthèse et de la sécrétion

La fonction thyroïdienne est placée sous le contrôle de la TSH hypophysaire, elle-même stimulée par la TRH hypothalamique. Cette régulation fonctionne en rétrocontrôle négatif. Un deuxième système de contrôle est assuré par l'autorégulation de l'iode intrathyroïdien.

### A. La régulation hypothalamo-hypophysaire, TRH-TSH (*fig.* 5)

Les hormones thyroïdiennes exercent sur l'hypophyse et l'hypothalamus un rétrocontrôle négatif (ou feed-back négatif) permettant de maintenir les concentrations circulantes d'hormones dans des limites précises. Un excès d'hormones T3 et T4 freinera la sécrétion centrale de TSH et de TRH. À l'inverse, un défaut d'hormones stimulera la synthèse et la sécrétion de TRH et de TSH, dont l'action stimulante

tendra à corriger ce défaut d'hormone. Le système fonctionne avec une amplification. Il existe une corrélation inverse entre T4 libre et le logarithme de la TSH : une diminution minime de la concentration de T4 libre entraînera une augmentation amplifiée de la concentration de TSH, et inversement. C'est pourquoi la concentration de TSH est l'indice le plus sensible de l'imprégnation hormonale tissulaire. Le rétrocontrôle est exercé par la fraction libre des hormones T4 et T3. Il existe au niveau hypophysaire une 5'-monodésiodase qui convertit la T4 en T3. Celle-ci se liera à son récepteur nucléaire dans les cellules thyréotropes.

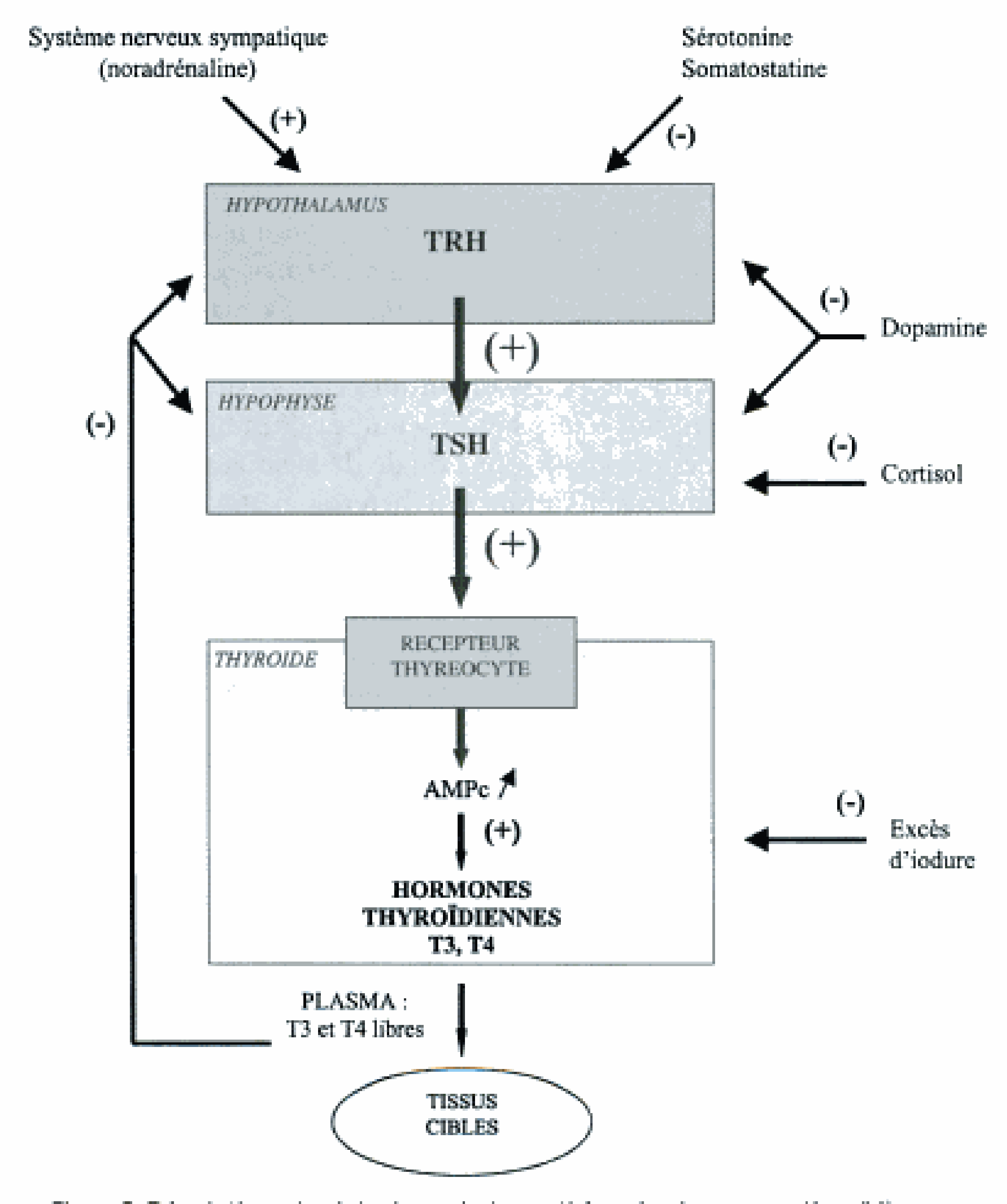



**Figure 5.** Régulation physiologique de la synthèse des hormones thyroïdiennes

La *TRH* est une neurohormone de trois acides aminés, synthétisée au niveau des noyaux paraventriculaires de l'éminence médiane de l'hypothalamus sous forme de pulses, suivant un rythme circadien à maximum nocturne. Les neurones hypothalamiques intègrent des informations venant des neurones corticaux, par l'intermédiaire de différents neuromédiateurs. Le froid induit une stimulation de la TRH par

l'intermédiaire des voies α-noradrénergiques. Les influences dopaminergiques et sérotoninergiques sont inhibitrices. La TRH est sécrétée dans le système porte hypophysaire et est transportée vers l'hypophyse antérieure où elle exerce une action stimulante sur les cellules thyréotropes et sur les cellules lactotropes, après liaison à un récepteur spécifique.

La *TSH* est une glycoprotéine constituée de deux chaînes α et β, associées de façon non covalente. La chaîne β est spécifique de la TSH. La chaîne α est commune avec d'autres hormones hypophysaires : FSH, LH et avec l'HCG chorionique. Chez l'homme, le gène qui code la sous-unité α est localisé sur le chromosome 6 alors que le gène codant la TSH β est porté par le chromosome 1. La synthèse de la sous-unité β constitue l'étape limitante de la synthèse de la TSH. Les glycosylations ont lieu de façon concomitante à la synthèse des sous-unités, puis il y a formation du dimère αβ, avant la sortie du réticulum endoplasmique. En fin de synthèse, la TSH humaine est une glycoprotéine de 28 à 30 kDa. La sous-unité α comporte 92 acides aminés et est N-glycosylée sur les Asn 52 et 78. La sous-unité β comporte 112 acides aminés et est glycosylée en 23. La présence des chaînes glycanes est indispensable pour que la TSH acquière son activité biologique. En particulier, la glycosylation en 52 permet l'association αβ, et la glycosylation en 78 augmente la stabilité de la sous-unité α. La structure des deux sous-unités est globalement superposable, les deux sous-unités s'organisant « tête-bêche » autour d'un noyau de ponts disulfure (nœud à cystéine ou *cystine knot*), une boucle de la sous-unité β formant une « ceinture » liant étroitement la sous-unité α. L'hétérogénéité des chaînes glycanes implique l'existence de plusieurs isoformes de la TSH, différant entre elles par leur point isoélectrique. Ces différentes formes sont le support de variations d'activité et de demi-vie biologique de l'hormone, avec ou sans retentissement clinique.

La TSH stimule toutes les étapes de l'hormonogenèse thyroïdienne, depuis la captation de l'iode jusqu'à la sécrétion (*fig.* 4), ainsi que la synthèse de la peroxydase et de la thyroglobuline. La TSH est également un facteur de croissance des thyréocytes, expliquant l'hyperplasie de la glande et la formation d'un goitre dans l'hypothyroïdie. L'action de la TSH sur les thyréocytes passe par la liaison à un récepteur spécifique. Le récepteur de la TSH appartient à la famille des récepteurs à sept segments transmembranaires couplés aux protéines G (activité GTPase). L'extrémité N-terminale du récepteur est située vers l'extérieur, l'extrémité C-terminale interne étant impliquée dans la transduction du signal. Le récepteur de la TSH, comme le récepteur des autres hormones glycoprotéiques, est caractérisé par la présence d'un volumineux domaine extracellulaire glycosylé qui constitue le site de liaison de l'hormone. Ce domaine est constitué de neuf répétitions imparfaites d'un motif d'environ 25 acides aminés riche en résidus leucine, (hélices α), impliqué dans les phénomènes de reconnaissance entre les protéines, et participant à la spécificité de l'assemblage hormone-récepteur (*fig.* 6).

Le gène du récepteur de la TSH est situé sur le chromosome 14 chez l'Homme. Il est constitué de dix exons. Les neuf premiers, dont l'organisation reflète celle des motifs répétés riches en leucine, codent pour le domaine extracellulaire. Le dernier, de grande taille, code pour les domaines transmembranaires et intracellulaire.

La liaison stéréospécifique de la TSH au niveau du domaine extracellulaire du récepteur entraîne l'activation du récepteur. Le signal est médié à la fois par les

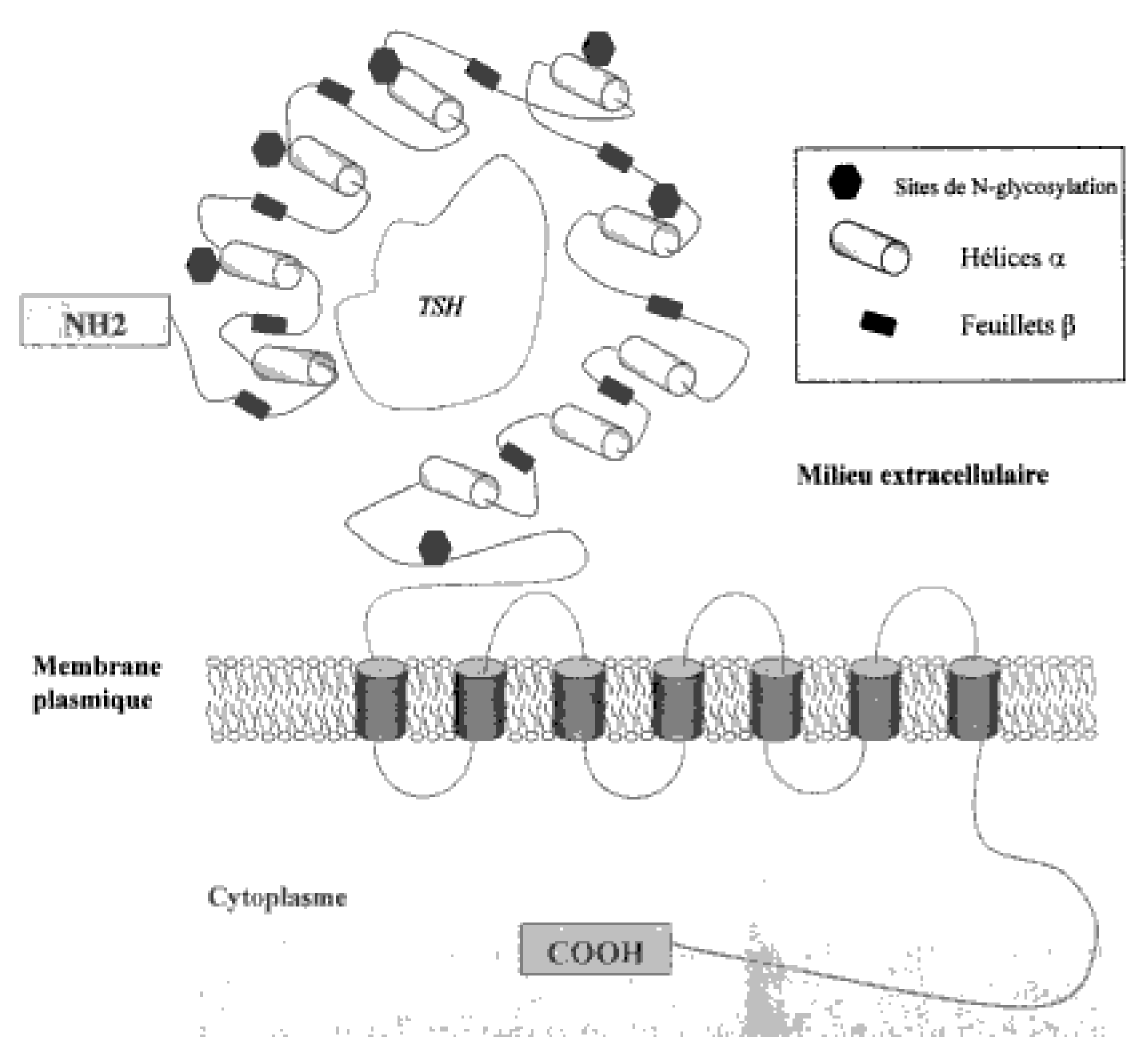



**Figure 6.** Structure du récepteur de la TSH

protéines G vers la production d'AMP cyclique et par la voie de l'inositol phosphate. Ces voies d'activation sont à l'origine des effets physiologiques de la TSH. Pour éviter une stimulation continue du thyréocyte, il existe au moins trois phosphodiestérases. De plus, l'iodure intrathyroïdien inhibe l'accumulation d'AMPc.

## B. Effet de l'iode sur la biosynthèse des hormones thyroïdiennes

Outre la régulation centrale, il existe un type de régulation unique à la glande thyroïde, qui lui donne la capacité de se protéger contre des excès d'iode.

### 1. Effet Wolff-Chaikoff

De fortes doses d'iode inhibent l'organification en T3 ou en T4, les précurseurs ne sont plus couplés. Cet effet, appelé « effet Wolff-Chaikoff », est le mécanisme majeur de protection contre la formation excessive d'hormones thyroïdiennes, qui est indépendant de la TSH. L'effet Wolff-Chaikoff nécessiterait la formation de composés iodés (lipides iodés ou iodolactones) dont le mode d'action n'est pas encore bien établi.
La plupart des effets inhibiteurs de l'iodure nécessitent la participation de la TPO, et l'iodure n'a plus d'effets s'il est administré en association avec des antithyroïdiens de synthèse bloquant l'activité de la peroxydase, comme le MMI (methylmercapto-imidazole) ou le PTU (propylthiouracile).

### 2. Notion de seuils

Des doses modérées d'iode (de l'ordre de $10^{-8}$ M de concentration intrathyroïdienne) entraînent une augmentation de la synthèse des iodothyronines T4 et T3. Des doses plus importantes ($10^{-6}$ M) entraînent une diminution de l'organification par effet Wolff-Chaikoff.

### 3. Échappement à l'effet Wolff-Chaikoff

L'inhibition de l'organification s'échappe au bout de 48 heures, et la persistance d'une surcharge iodée n'empêche plus l'iode de s'organifier, la synthèse reprend. Cet échappement empêche la survenue d'une hypothyroïdie. L'absence de cet échappement est à l'origine de certaines hypothyroïdies induites par l'iode.

## VI. Les hormones thyroïdiennes circulantes

Dès leur sortie du thyréocyte, les hormones thyroïdiennes sont prises en charge par trois protéines plasmatiques, toutes trois synthétisées par le foie :
- la TBG (*thyroxine-binding globulin*), glycoprotéine spécifique du transport de T4 et T3 ;
- la TBPA (*thyroxine-binding prealbumin* ou transthyrétine) ;
- l'albumine ;
- certaines lipoprotéines contribuent au transport des hormones de façon négligeable.

La concentration et l'affinité de ces protéines sont très différentes (*tab. 1*). La liaison des hormones à ces protéines conditionne leur diffusion et les soustrait à la filtration glomérulaire. L'élimination urinaire des hormones est presque nulle.
La forme active des hormones est la forme libre, immédiatement utilisable par les tissus, mais très minoritaire par rapport à la fraction liée. À l'état physiologique, les modifications de concentrations des protéines de transport n'affectent que la fraction liée des hormones : la fraction libre reste inchangée. Forme libre et forme liée sont en équilibre dynamique, et leurs concentrations obéissent aux lois de la thermodynamique des équilibres. Les hormones thyroïdiennes T3 et T4 ne suivent pas de rythme circadien.

**Tableau 1.** Hormones thyroïdiennes et protéines de transport

| | | TBG | TBPA | Albumine | Fraction libre |
|---|---|---|---|---|---|
| T4 | % hormone liée<br>Affinité | 75 à 80 %<br>$2\ 10^{10}\ M^{-1}$ | 15 à 20 %<br>$10^{8}\ M^{-1}$ | 5 à 10 %<br>$2\ 10^{6}\ M^{-1}$ | 0,03 % |
| T3 | % hormone liée<br>Affinité | 75 à 80 %<br>$10^{9}\ M^{-1}$ | < 10 %<br>$5\ 10^{6}\ M^{-1}$ | 10 %<br>$4\ 10^{5}\ M^{-1}$ | 0,3 % |

La T4 est beaucoup moins diffusible dans les tissus à cause de sa grande affinité pour les protéines de transport. La T3 est moins liée et plus diffusible, elle a un

métabolisme tissulaire plus rapide et son affinité pour les récepteurs intracellulaires est plus importante.
La T4 présente dans le sang provient exclusivement de la glande (en dehors d'une administration thérapeutique). La T3 présente dans le sang provient quant à elle majoritairement (70 %) de la désiodation périphérique de T4 en T3 (*fig. 7*). Cette désiodation en 5' se fait sous l'action d'une monodésiodase de type I, sélénoprotéine présente au niveau du foie, des reins, et du muscle. Cette désiodation peut se faire également en position 5 et aboutit alors à un composé triiodé inactif, la T3 reverse. La production périphérique de T3 ou de T3 reverse dépend étroitement des conditions métaboliques : en situation de jeûne, de fièvre, d'acidose tissulaire, d'insuffisance hépatique ou rénale, la désiodation aboutit à la T3 reverse inactive. Ce mécanisme de désiodation représente une adaptation métabolique qui vise à minimiser les métabolismes de base dans les altérations de l'état général. Les caractéristiques comparées de ces deux hormones sont rassemblées dans le *tableau* 2.

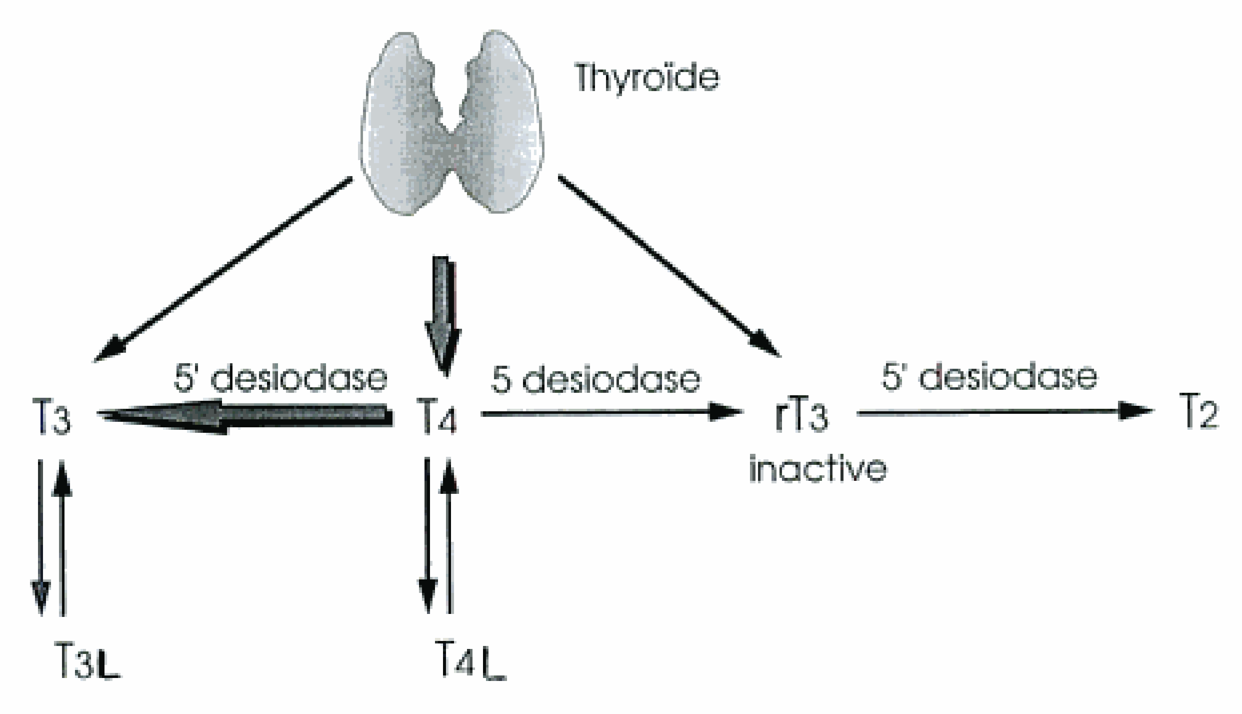



**Figure 7.** Métabolisme périphérique

**Tableau 2.** Caractéristiques métaboliques de T4 et T3 chez un sujet euthyroïdien

| | T4 | T3 |
|---|---|---|
| Origine | 100 % thyroïde | 1/3 thyroïde<br>2/3 périphérie |
| Espace de distribution (litres) | 9 | 37 |
| Demi-vie | 7 jours | 1 jour |
| Constante d'épuration (%) par jour | 11 % | 69 % |
| Forme totale circulante (concentration moyenne) | 100 nmol/L | 2 nmol/L |
| Forme libre circulante | 10-30 pmol/L | 3-6 pmol/L |

# VII. Catabolisme des hormones thyroïdiennes

Le catabolisme des hormones thyroïdiennes s'effectue au niveau périphérique principalement par quatre processus (*fig. 8*) :

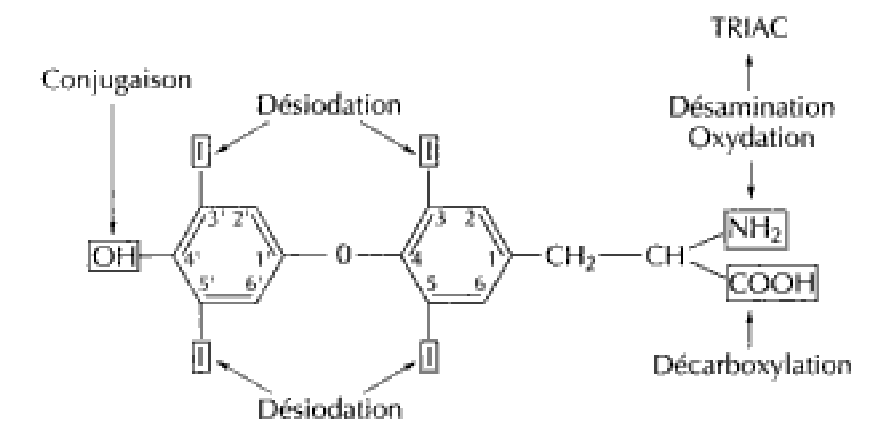



**Figure 8.** Catabolisme des hormones thyroïdiennes

- désiodation (*tab. 3*) : la T4 est désiodée en 5' ou en 5, conduisant respectivement à la T3 active, ou à la T3 reverse inactive, puis les désiodations se poursuivent en cascades en 3' et en 3 avec d'autres désiodases. Elles aboutissent à la T2 et à la T1 ;
- conjugaison : T3 et T2 sont sulfoconjuguées dans le foie, sur la fonction phénol, et aboutissent aux dérivés sulfates. T4 est sulfo- et glucuroconjuguée dans le foie et le rein, également sur la fonction phénol. Il existe un cycle entérohépatique des hormones conjuguées. Les formes conjuguées sont sécrétées avec la bile dans le duodénum. Une partie est hydrolysée dans l'iléon et réabsorbée ;
- décarboxylation ;
- désamination oxydative de la chaîne alanyl : elle conduit à la formation de dérivés pyruviques et lactiques qui après nouvelle oxydation engendrent des dérivés tri- et tétraacétylés : TRIAC (acide triiodothyroacétique) et TETRAC (acide tétraiodothyroacétique) dont l'activité biologique est atténuée par rapport à, respectivement, celles de la T3 et de la T4. Le TRIAC a gardé un pouvoir frénateur important sur l'hypophyse, mis à profit en thérapeutique dans certaines situations cliniques rares comme la sécrétion inappropriée de TSH.

**Tableau 3.** Principales caractéristiques des désiodases

| Caractéristiques | Type I | Type II | Type III |
|---|---|---|---|
| Localisation | Foie, reins, muscle | Hypophyse, SNC | Tous tissus, placenta |
| Site d'action | 5, 5' (cycles interne et externe) | 5' (cycle externe) | 5 (cycle interne) |
| Inhibée par | Iode, propylthiouracile | Iode, T4 | Iode |

# VIII. Mécanisme d'action des hormones thyroïdiennes

## A. Transport intracellulaire et désiodation

La pénétration intracellulaire des hormones thyroïdiennes se fait par transport actif grâce à un transporteur ATP dépendant, impliquant un gradient transmembranaire d'ions $Na^+$. La T4 subit une désiodation pour aboutir à la forme active T3.

## B. Action au niveau nucléaire

L'action des hormones est attribuée à une modulation de la transcription d'un certain nombre de gènes cibles et met en jeu des récepteurs nucléaires de la T3, agissant sur des séquences génomiques spécifiques. Le récepteur lie d'une part la T3 et, d'autre part, les gènes répondant à cette hormone. Ces récepteurs ont une affinité dix fois plus importante pour la T3 que pour la T4. L'existence de récepteurs mitochondriaux expliquant les effets non génomiques de la T3 a été évoquée. Les tissus les plus riches en récepteurs sont l'antéhypophyse et le foie.

# IX. Effets biologiques des hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes interviennent pour la plupart des tissus de vertébrés dans la différenciation, la croissance, la calorigenèse et le maintien de l'homéostasie métabolique. Leur action est ubiquitaire.

## A. Action des hormones sur la synthèse et la sécrétion de TSH

La cellule thyréotrope hypophysaire est une cellule cible des hormones dont l'action est d'inhiber la sécrétion de TSH. La T4 exerce un rôle majeur de suppression de la sécrétion après conversion intrapituitaire en T3 par la 5'-désiodase de type II. La T3 liée aux récepteurs nucléaires hypophysaires diminue d'abord la sécrétion, puis la synthèse de TSH. Le complexe T3-récepteur agit directement sur les gènes codant pour les sous-unités $\alpha$ et $\beta$.

## B. Action sur le développement (croissance et différenciation)

Les hormones thyroïdiennes sont essentielles pour la différenciation et la maturation des tissus fœtaux. Après la naissance, les hormones thyroïdiennes sont indispensables au développement du système nerveux, et à la croissance du squelette et de tous les organes. Une insuffisance thyroïdienne entraîne chez l'enfant une hypotrophie des neurones corticaux aboutissant à la conservation des caractères infantiles du cerveau (crétinisme), ce qui justifie la mise en place d'un dépistage systématique de l'hypothyroïdie congénitale (depuis 1979), touchant environ un

bébé sur 3 400 en Europe (deux cents cas par an en France). Les hormones thyroïdiennes stimulent la synthèse des protéines enzymatiques, c'est-à-dire activent la synthèse des principaux éléments de la structure cellulaire.

## C. Action de régulation de l'activité métabolique

Les hormones thyroïdiennes contrôlent le métabolisme des glucides, des lipides (cholestérol, triglycérides) et de l'azote (urée, créatinine), et surtout de la calorigenèse, c'est-à-dire la capacité d'augmenter la consommation d'$O_2$ et la production de chaleur. La consommation d'$O_2$ a lieu dans les mitochondries dont la croissance et le nombre sont stimulés par les hormones thyroïdiennes :

- elles entraînent une élévation de la lipolyse ;
- elles interviennent à toutes les étapes du métabolisme des glucides : elles augmentent la glycolyse, mais stimulent aussi la gluconéogenèse. Elles agissent en relation avec les catécholamines par augmentation du nombre de récepteurs adrénergiques ;
- elles stimulent la synthèse peptidique (sauf sur les enzymes de synthèse de la TSH qu'elles répriment), mais leur action catabolisante prédomine dans les hyperthyroïdies ;
- la T3 a également une action directe sur le système nerveux sympathique et potentialise l'effet des catécholamines par augmentation du nombre de récepteurs adrénergiques. Ainsi l'administration des bêtabloquants agit efficacement sur les symptômes de cardiothyréose observés lors des hyperthyroïdies.

## D. Actions viscérales

Tous les tissus de l'organisme sont sensibles aux hormones thyroïdiennes : au cours des dysthyroïdies, de nombreux symptômes peuvent être observés. Chez l'adulte, les hormones thyroïdiennes règlent la vitesse des réactions enzymatiques cellulaires dans presque tous les organes (*tab. 4*).

**Tableau 4.** Principaux effets observés au cours des dysthyroïdies

| | Hyperthyroïdie | Hypothyroïdie |
|---|---|---|
| Cœur | Tachycardie<br>Débit cardiaque ↑<br>Troubles du rythme | Bradycardie<br>Débit cardiaque ↓<br>Blocs auriculo-ventriculaires |
| Muscles | Myasthénie<br>Décontraction rapide (réflexogramme court) | Myotonie<br>Crampes<br>Décontraction lente (réflexogramme lent) |
| Système nerveux | Nervosité<br>Agressivité<br>Hyperémotivité | Apathie<br>Ralentissement<br>Dépression |
| Tube digestif | Diarrhée | Constipation |
| Thermogenèse | Sueurs, soif, thermophobie | Hypothermie, frilosité |
| Peau, phanères | | Peau sèche, infiltrée, perte de cheveux, dépilation des sourcils |
| Lipides | | Hypercholestérolémie, hypertriglycéridémie |
| Hématopoïèse | Leucopénie, thrombopénie | Anémie normo- ou macrocytaire |

# X. Variations physiologiques

## A. Âge

Chez le nouveau-né, on observe un pic néonatal de TSH à l'accouchement. Ce pic serait lié à une adaptation physiologique de la thermogenèse et à la réponse cardiovasculaire, qui sont deux mécanismes importants de la transition intra- et extra-utérine. Le taux de TSH se stabilise au niveau de celui de l'adulte au cours des premières semaines de la vie. Le dépistage néonatal de l'hypothyroïdie se fait au troisième jour de la vie et s'appuie sur le dosage de TSH effectué sur quelques gouttes de sang prélevées au talon du bébé. Chez l'enfant, il existe une sécrétion préférentielle de la T3 par rapport à l'adulte. Chez la personne âgée, on observe souvent une T3 basse, mais qui est le plus souvent en relation avec un mauvais état général ou la prise de médicaments inhibant la désiodation de T4 en T3.

## B. La grossesse

Au cours de la grossesse, les besoins en hormones thyroïdiennes sont augmentés, ainsi que les besoins en iode. Sous l'influence de l'hyperestrogénie, il y a une augmentation de la TBG, et donc augmentation des concentrations d'hormones totales, les concentrations d'hormones libres restant proches des valeurs observées avant la conception. Au premier trimestre de grossesse, les concentrations élevées d'HCG placentaire entraînent une stimulation de la thyroïde, car l'HCG possède une activité *TSH-like*.

## C. Rythme circadien

La TSH est sécrétée selon un rythme circadien avec un pic nocturne (valeurs maximales entre 23 heures et 4 heures). Le profil de sécrétion de la TSH établi sur 24 heures met en évidence la pulsatilité de la sécrétion de TSH, avec 9 à 17 pulses par jour. La pulsatilité est médiée par des signaux venant des noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus.

## L'essentiel de la question

La glande thyroïde a pour fonctions spécifiques, d'une part, de produire les hormones thyroïdiennes T4 et T3 nécessaires à de nombreux métabolismes, à la croissance, au développement et à la maturation de différents organes, en particulier du système nerveux et, d'autre part, de participer à l'homéostasie calcique, par la production de calcitonine, hormone hypocalcémiante.
L'action des hormones T3 et T4 est ubiquitaire sur presque tous les tissus : elles régulent aussi bien le métabolisme énergétique (et participent à l'adaptation au froid), que la synthèse des protéines et la lipolyse.

La biosynthèse de T3 et T4, hormones iodées, est contrôlée par la régulation hypothalamo-hypophysaire (rétrocontrôle négatif), et par un système intrathyroïdien original et spécifique dépendant de l'iode. La thyroglobuline est le support macromoléculaire de la biosynthèse des hormones et leur forme de stockage dans la glande. Les étapes de la synthèse et de la sécrétion sont :

- la captation de l'iode au niveau du pole basal du thyréocyte ;
- l'oxydation et l'organification de l'iode sur la thyroglobuline, au niveau du pôle apical ;
- la condensation des précurseurs iodotyrosines (MIT et DIT) en iodothyronines T3 et T4 ;
- la pinocytose de la colloïde ;
- la protéolyse de la thyroglobuline ;
- le recyclage de l'iode intrathyroïdien par désiodation des précurseurs libérés ;
- la sécrétion au niveau du pôle basal.

Le transporteur de l'iode, la thyroglobuline et la thyroperoxydase sont les constituants cellulaires majeurs nécessaires à la biosynthèse, avec l'iode, élément rare apporté par l'alimentation. Toutes les étapes de la synthèse et de la sécrétion sont stimulées par la TSH, hormone majeure de la régulation, dont l'action passe par la liaison à un récepteur spécifique.

Les hormones T3 et T4 circulent sous forme majoritairement liée à des protéines de transport. Seules les formes libres, quantitativement très minoritaires, sont responsables des actions métaboliques et du rétrocontrôle. Physiologiquement, la T4 circulante provient exclusivement de la glande thyroïde, alors que la T3 circulante provient majoritairement de la désiodation périphérique de la T4. Cette désiodation est très dépendante des conditions métaboliques. La T3 est l'hormone la plus active biologiquement, son action passe par la liaison à un récepteur nucléaire.

### *Pour en savoir plus*


- *La Thyroïde*. Paris, Elsevier, 2001.
- Braverman L.E., Utiger R.D. *Werner and Ingbar's The Thyroid : a fundamental and clinical text*. Lippincott Williams & Wilkins, Raven, Philadelphia (États-Unis).
- Perlemuter L., Thomas J.-L. *Endocrinologie*. Paris, Abrégés Masson, 2003.
- http://www.thyroidmanager.org

# Physiologie de la grossesse

P. LABRUDE, F. BONNEAUX, M.-M. GALTEAU
Faculté de pharmacie, Université Henri Poincaré, Nancy I.
M.-O. DELAPORTE, Maternité régionale, Nancy.

**I. La grossesse, ses étapes**

- **A.** Définitions, durée, détermination du terme, signes, étapes
- **B.** Fécondation et migration de l'œuf
- **C.** Nidation ou ovo-implantation
- **D.** Embryogenèse, morphogenèse et période fœtale

**II. Annexes du fœtus et leurs fonctions, le placenta**

- **A.** Définition
- **B.** Trophoblaste
- **C.** Placenta et fonctions
- **D.** Cavité et liquide amniotiques

**III. Physiologie endocrinienne de la grossesse et de l'unité fœto-placentaire**

- **A.** Hormones et nidation
- **B.** Hormones et sécrétions de la phase placento-ovarienne (premier trimestre)
- **C.** Hormones de l'unité materno-fœto-placentaire (deuxième et troisième trimestres)
- **D.** Hormones dans l'accouchement (ou parturition) et post-partum
- **E.** Lactation

**IV. Modifications de l'organisme maternel au cours de la grossesse**

- **A.** Modifications biologiques et physiologiques
- **B.** Variations hormonales non spécifiques
- **C.** Modifications générales et locales

*Avertissement et limites de la question*
*La physiologie de la grossesse normale, de la fécondation jusqu'aux modifications physiologiques chez la mère, est quasiment impossible à traiter dans le cadre limité d'une question d'internat.*
*Ainsi, seuls les points essentiels seront envisagés. La question traitera successivement du déroulement et des étapes de la grossesse, du placenta et de ses fonctions, de l'endocrinologie de la grossesse et de l'unité fœto-placentaire et, enfin, des modifications de l'organisme maternel.*
*La question ne comporte pas de notions de pathologie, ni le diagnostic biologique, mais on peut brièvement envisager de parler de quelques signes utiles à connaître et de certains dosages biologiques.*
*Pour l'embryogenèse, la compréhension sera facilitée par la lecture de schémas classiques d'embryologie de l'enseignement de première année. Les normes biologiques de la grossesse permettront au pharmacien d'éviter d'interpréter comme pathologique ce qui est physiologique.*

# I. La grossesse, ses étapes

## A. Définitions, durée, détermination du terme, signes, étapes

### 1. Définitions

- L'état de la femme depuis la fécondation jusqu'à l'expulsion du fœtus.
- La durée de cet état.

### 2. Durée et terme

- La connaissance précise du début de la grossesse permet d'en déterminer le terme théorique : neuf mois de grossesse, ou 41 semaines et trois jours d'aménorrhée.
- En dehors des situations particulières où la date de conception est certaine (procréation médicalement assistée notamment), la date des dernières règles est à la base de la détermination du terme : pour un cycle de 28 jours, le début de la grossesse est fixé au quatorzième jour de ce cycle. Pour des cycles d'une autre durée, il convient de se souvenir que la phase postovulatoire est constante et égale à quatorze jours.
- L'âge de la grossesse peut être exprimé en semaines d'aménorrhée (SA) ou en mois de grossesse, et une correspondance entre ces deux modes de calcul peut être établie. Ainsi, trois mois de grossesse correspondent à quinze SA, six mois à 28 SA et neuf mois à 41 SA.

### 3. Signes de la grossesse avant la douzième semaine

Ils sont constitués par l'aménorrhée, par les modifications de l'utérus et par plusieurs signes fonctionnels et physiques accessoires.

#### a) Aménorrhée

Tout retard de règles chez une femme en phase d'activité génitale est une grossesse jusqu'à preuve du contraire, y compris aux âges extrêmes de la vie génitale et même sous contraception, toute méthode ayant son pourcentage d'échec. La grossesse est le premier diagnostic à envisager face à une aménorrhée.

#### b) Signes fonctionnels accessoires

- Ils sont dus aux modifications hormonales.
- Les signes dits « sympathiques » ont peu d'intérêt diagnostique. Il s'agit de :
  - troubles digestifs : nausées, vomissements, sialorrhée, constipation ;
  - troubles nerveux : irritabilité, insomnie, somnolence diurne, envies, dégoûts ;
  - troubles urinaires : pollakiurie (mictions fréquentes et peu abondantes) ;
  - gonflement général, turgescence mammaire.
- La multipare connaissant les symptômes de grossesse se sait enceinte.

#### c) Modifications utérines

- Col violacé.
- Utérus augmenté de volume.

### 4. Étapes de la grossesse

La grossesse comporte plusieurs étapes (ou périodes) de longueurs variables :
- la fécondation et la migration de l'œuf ;
- la nidation ou ovo-implantation ;
- l'embryogenèse ;
- la morphogenèse et l'organogenèse (deuxième mois) ;
- la période fœtale jusqu'à l'accouchement.

## B. Fécondation et migration de l'œuf

### 1. Définition

La fécondation est le résultat de la rencontre de deux gamètes, un ovocyte et un spermatozoïde, chacun haploïde. Cette « rencontre » crée un nouvel individu diploïde.
Sa réalisation nécessite des phénomènes préparatoires. La cellule mère est à l'origine de toutes les cellules de l'œuf par segmentation.

### 2. Étapes préalables

#### a) Préparation de l'ovocyte et l'ovulation

L'ovocyte subit une maturation depuis le stade du follicule primordial jusqu'au stade du follicule antral. Seul un follicule dit « dominant » arrivera jusqu'à l'ovulation. Il est plus riche en récepteurs de l'hormone folliculostimulante (FSH), mais surtout il exprime le récepteur de l'hormone lutéinisante (LH) et reste alors seul sensible à l'effet antiapoptotique de cette dernière.

L'élément initiateur clé est la décharge d'hormones gonadotropes (surtout LH, mais aussi FSH). Son début intervient 35 à 40 heures avant l'ovulation, lorsque la concentration sérique d'estradiol (ou E2) est supérieure à 200 pg/ml. Ce pic de LH est induit par le rétrocontrôle positif des estrogènes (essentiellement E2), qui est potentialisé par la quantité croissante de progestérone.

### b) Maturation de l'ovocyte et des cellules folliculaires péri-ovocytaires

Après ce pic de LH, la maturation cellulaire s'accélère.

### c) Modifications du follicule

Dispersion cellulaire (*loosening*). Quelques heures après la décharge gonadotrope, les cellules du cumulus (cellules folliculaires qui demeurent autour de l'ovocyte) sécrètent des glycoprotéines qui s'intercalent entre elles et les dissocient : c'est la dispersion cellulaire. La FSH semble être la principale hormone responsable de ce phénomène mais sous la dépendance de la LH. Ce phénomène :

- facilite le détachement de l'ovocyte au moment de l'ovulation ;
- constitue une masse visqueuse péri-ovocytaire pour piéger les spermatozoïdes ;
- intervient dans la capacitation et la réaction acrosomiale.

### d) Modifications du liquide folliculaire

La stimulation de la stéroïdogenèse sous l'action de la LH et de la FSH entraîne la chute de la concentration d'E2, l'augmentation de la progestérone et la modification des concentrations hormonales du liquide folliculaire. Ces éléments occasionnent une augmentation rapide du volume du follicule qui atteint 21 à 25 mm de diamètre.

### e) Modifications ovocytaires

La maturation de l'ovocyte comporte des modifications nucléaires et cytoplasmiques indispensables à la création des trois conditions d'une fécondation normale :

- aptitude à être reconnu et pénétré par le gamète mâle ;
- aptitude à assurer la formation simultanée des pronucléus mâle et femelle après fécondation ;
- aptitude à aboutir au développement embryonnaire normal.

### f) Modifications nucléaires

Depuis la vie embryonnaire (de la huitième à la treizième semaine), les ovocytes sont bloqués dans leur évolution (cellule à 4n chromosomes). Vingt-quatre heures après le début du pic de LH, la chromatine se condense et l'ovocyte poursuit sa méiose et devient une cellule à 2n chromosomes. Le premier globule polaire est expulsé, la méiose se bloque de nouveau et ne s'achèvera qu'après la fécondation. Ce mécanisme de blocage puis de reprise de la méiose n'est pas clair. Il pourrait s'agir d'un blocage :

- par un facteur spécifique, sécrété par les cellules de la granulosa : OMI (*ovum meiosis inhibitor*), qui pourrait être l'hypoxanthine ;
- par l'effet inhibiteur de la quantité intra-ovocytaire élevée d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc).

Sous l'action de la décharge gonadotrope, la diminution de la synthèse d'OMI et d'AMPc entraînerait la levée de l'inhibition et la reprise de la méiose.
Ainsi, la maturation nucléaire est terminée 22 à 36 heures après le début du pic de LH.

### g) Modifications cytoplasmiques

Elles sont probablement stéroïdodépendantes avec :
- synthèse d'un facteur de décondensation du noyau du spermatozoïde (MPGF, *male pronucleus growth factor*) ;
- réaménagement des organites cytoplasmiques.

### h) Ovulation

C'est la rupture de la paroi folliculaire puis l'expulsion de l'ovocyte 35 à 40 heures après le début du pic de LH. Les mécanismes régissant ce phénomène sont :
- l'augmentation rapide du volume du follicule par dispersion cellulaire et par augmentation du volume du liquide folliculaire ;
- la libération dans le liquide folliculaire de substances protéolytiques et fibrinolytiques provenant de la granulosa sous l'action des prostaglandines $PGE_2$ ;
- la contraction des fibres musculaires ovariennes sous l'action des prostaglandines $PGF_2$.

Expulsé, l'ovocyte mûr, prêt à être fécondé, entouré de son cumulus visqueux, est capté par les franges pavillonnaires de la trompe. La fécondation a lieu le plus souvent dans l'ampoule tubaire. Elle est possible pratiquement partout dans la trompe et aussi dans le liquide péritonéal du cul-de-sac de Douglas. Dans ce cas, la captation par la trompe est faite secondairement.

### i) Ascension des spermatozoïdes du vagin à l'ampoule tubaire et acquisition du pouvoir fécondant

L'ascension des spermatozoïdes dans le tractus femelle va permettre une sélection des gamètes mâles et l'acquisition du pouvoir fécondant.

### j) Passage du col utérin et de sa glaire

Le sperme coagule au fond du vagin en emprisonnant les spermatozoïdes. Puis, en moins d'une heure, les enzymes protéolytiques du plasma séminal, activées par le pH acide du vagin, lysent le coagulum en permettant la libération des spermatozoïdes.
Les plus mobiles (environ 1 %) parviennent à franchir la barrière cervicale pour atteindre l'utérus. Les autres sont détruits. La qualité de la glaire cervicale est fondamentale : elle permet d'orienter le trajet des spermatozoïdes vers l'utérus par un réseau de glycoprotéines.
La glaire est maximale dans les deux à trois jours qui précèdent l'ovulation (claire, abondante, filante et cristallisant en feuilles de fougère). Ses caractères, en particulier sa teneur hydrique, sont estrogénodépendants. Après l'ovulation, la glaire s'altère rapidement et ne permet plus le passage des spermatozoïdes.
Le rôle de cette barrière cervicale est :
- la sélection des gamètes et l'initialisation de la capacitation. Au passage de la glaire, les spermatozoïdes se libèrent du plasma séminal et prostatique qui contient des facteurs de stabilisation inhibant la capacitation ;
- c'est aussi un filtre antibactérien.

#### k) Passage de l'utérus à l'ampoule tubaire

Le parcours sera réalisé, dans sa plus grande part, grâce aux contractions de l'utérus et de la trompe. Mais une grande partie des spermatozoïdes ayant franchi la barrière cervicale va se perdre dans les glandes utérines et au passage de la zone utéro-tubaire. Puis, un nombre important va dans la cavité abdominale. Ainsi, seules quelques centaines de spermatozoïdes seront présents pour la fécondation.

#### l) Capacitation et réaction acrosomiale

Les spermatozoïdes d'un éjaculat sont incapables de fécondation. Ils doivent capaciter. La capacitation est un ensemble de modifications de la structure membranaire, en particulier l'élimination des glycoprotéines protectrices et stabilisantes du liquide séminal.
Elle débute au passage à travers la glaire cervicale et se poursuit avec les sécrétions utérines et tubaires. Elle permet donc aux spermatozoïdes d'atteindre progressivement un état instable les rendant aptes à la réaction acrosomiale qui est une modification morphologique entraînant la fusion de la membrane cytoplasmique et de la membrane acrosomique externe avec libération des enzymes acrosomiales.
Sans cette maturation normale des gamètes, la fécondation ne peut se réaliser.

### 3. Fécondation proprement dite

Elle se définit en quatre étapes.

#### a) Traversée des annexes ovocytaires

- Le contact des spermatozoïdes avec les cellules péri-ovocytaires : au contact de la *corona radiata* (barrière protectrice de l'ovocyte), les spermatozoïdes entament leur réaction acrosomiale et pénètrent jusqu'à la membrane pellucide en dissociant les cellules péri-ovocytaires. Cette progression se fait grâce aux enzymes acrosomiales (hyaluronidase, etc.) et à des mouvements flagellaires.
- La traversée de la zone pellucide, pour un seul spermatozoïde :
  - fixation à la membrane pellucide par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique d'espèce ZP3 ;
  - perforation de la membrane grâce à l'acrosine (enzyme acrosomiale libérée au cours de la réaction acrosomiale) ;
  - traversée de la zone pellucide grâce à un accroissement de la mobilité du flagelle ;
  - contact avec la membrane ovocytaire.

#### b) Fusion gamétique

« Le spermatozoïde sombre dans l'ovule comme un navire dans la mer. » Il s'agit de la fusion de la membrane interne de l'acrosome et de la membrane cytoplasmique de l'ovule jusqu'à l'intégration complète du spermatozoïde. La pièce intermédiaire et le flagelle dégénèrent secondairement.

#### c) Activation du zygote

- Réaction corticale : au moment de la fusion des gamètes, les granules corticaux libèrent leur contenu dans l'espace périvitellin ce qui, en modifiant la structure de la membrane cytoplasmique et de la zone pellucide, empêche leur franchissement par d'autres spermatozoïdes afin d'éviter la polyspermie.

- Achèvement de la méiose ovocytaire :
  - formation du pronucléus femelle ;
  - expulsion du deuxième globule polaire.
- Formation du pronucléus mâle.

### d) Restauration de la diploïdie

- Environ dix heures après la pénétration du spermatozoïde, le pronucléus mâle migre vers son homologue femelle. Ils fusionnent et, à la vingtième heure, la diploïdie est établie.
- Vers la 35[e] heure, l'œuf est au stade 2 blastomères.

## 4. Migration

C'est le transport de l'œuf dans la trompe depuis le site de fécondation jusque dans l'utérus (*fig. 1*).

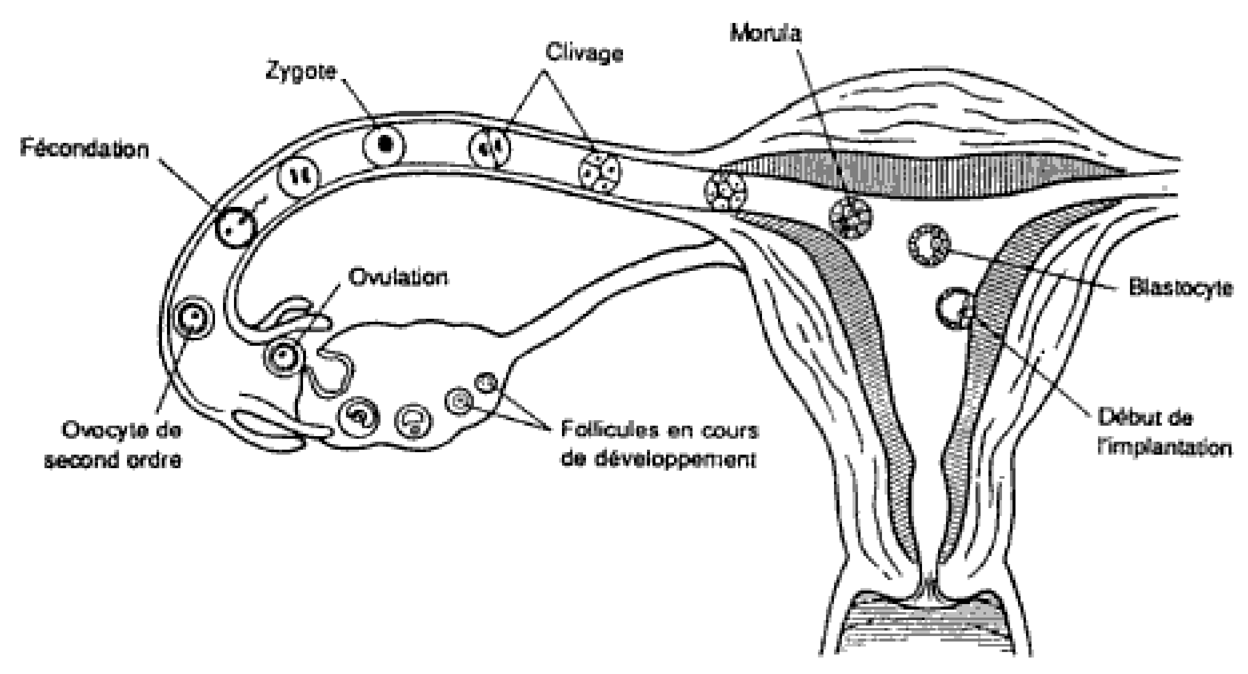



**Figure 1.** La migration tubaire, l'évolution et l'implantation utérine de l'œuf dans l'espèce humaine (d'après « Anatomie et physiologie humaines, cours et problèmes », Van de Graaf et Rhees, Mac-Graw Hill, Paris, 1989 p. 313)

Trois types de facteur influencent la migration :
- les mouvements ciliaires de l'épithélium tubaire orientés vers l'utérus, qui sont les éléments essentiels ;
- l'activité musculaire tubaire ;
- les mouvements du liquide tubaire qui semblent orientés de l'utérus vers le pavillon. La diminution de ce flux facilite la migration.

On décrit deux étapes : la stagnation et le passage de l'isthme.

### a) Stagnation

Elle a lieu dans l'ampoule pendant environ 48 heures au cours desquelles l'embryon va passer du stade à deux cellules au stade à huit cellules ou blastomères (morula) sans augmentation de volume.

#### b) Passage de l'isthme

- La progestérone augmente progressivement en entraînant une levée de ce « spasme physiologique » et une augmentation des mouvements ciliaires.
- Cela aboutit au passage de l'isthme en dix à douze heures, possible par une augmentation de la contraction des fibres musculaires lisses et des mouvements ciliaires, et par une diminution, voire une inversion, du flux du liquide tubaire. L'œuf libre arrive au stade de huit à seize blastomères dans l'utérus, trois ou quatre jours après la fécondation.

## C. Nidation ou ovo-implantation

Elle marque le début de la gestation.

### 1. Définitions

- *Nidation anatomique* : il s'agit de la pénétration active et complète de l'œuf fécondé dans un endomètre préparé pour cela.
- *Nidation physiologique* : il s'agit de la mise en place de relations fonctionnelles étroites de l'œuf avec l'organisme maternel. La nidation est terminée et réussie quand les relations vasculaires qui marquent le début de la formation du placenta sont établies.

### 2. Phénomènes préparatoires

- L'œuf réalise sa migration tubaire en quelques jours puis reste libre deux jours dans la cavité utérine. Dans un œuf de 58 cellules, appelé « morula » et âgé de 96 heures, commence à apparaître une cavité centrale, le blastocèle, bordée par une couche unicellulaire, le trophoblaste. Ce dernier va se différencier en cytotrophoblaste et syncytiotrophoblaste. Il se développe parallèlement au bouton embryonnaire comprenant des petites cellules endodermiques et des grandes cellules ectodermiques et la cavité amniotique. Le blastocyte (ou blastocyste) se forme.
- La cavité utérine : l'endomètre doit avoir subi la préparation prénidatoire œstro-progestative vers les 19$^{e}$-20$^{e}$ jours.

### 3. Nidation proprement dite

Elle siège le plus souvent au tiers supérieur de la cavité utérine, dans la partie fundique postérieure qui est la partie la plus vascularisée. Le bouton embryonnaire se met en contact avec l'endomètre. Les microvillosités en provenance de l'œuf et des cellules endométriales s'interpénètrent alors étroitement. La rupture des membranes cellulaires de l'endomètre et du trophoblaste réalise une fusion des cytoplasmes par avancée du trophoblaste qui érode l'épithélium et pénètre ensuite le chorion. Puis le trophoblaste pénètre les vaisseaux maternels dont la lumière est bordée de trophoblaste syncytial qui a remplacé en partie l'endothélium vasculaire.
Enfin, intervient la période lacunaire, du neuvième au douzième jour, caractérisée par l'apparition dans le trophoblaste de zones d'amincissement, les lacunes trophoblastiques, qui forment l'espace intervilleux et qui contiennent des globules rouges maternels provenant de la perforation du réseau capillaire maternel. C'est le début de la circulation utéro-placentaire. Le disque embryonnaire est alors didermique.

Le blastocyste finit sa pénétration et l'épithélium utérin rétablit sa continuité. Le développement ultérieur de l'œuf, inclus dans l'épaisseur de l'endomètre, va le cliver et permettre d'individualiser ultérieurement plusieurs territoires endométriaux. On peut ainsi différencier les caduques :
- basale : endomètre interposé entre l'œuf et le muscle utérin ;
- réfléchie : interposée entre l'œuf et la lumière utérine ;
- pariétale : qui recouvre le reste de la cavité utérine.

### 4. Déterminismes

#### a) Déterminisme hormonal

Les estrogènes sont nécessaires à la préparation de l'endomètre et aux modifications du trophoblaste et à l'acquisition du pouvoir invasif du blastocyste. Celui-ci, par sécrétion d'hormones gonadotropes chorioniques (hCG), a un effet lutéotrope (favorable au développement du corps jaune) et limite la sécrétion de prostaglandines F2α lutéolytiques (*voir plus loin*).

#### b) Déterminisme immunologique

La tolérance de la greffe allogénique que constitue l'œuf s'explique par plusieurs mécanismes, dont l'absence d'antigénicité du trophoblaste (qui représente en lui-même une barrière immunologique) et par un phénomène de facilitation immunologique due à la production d'anticorps bloquants :
- masquage des antigènes d'histocompatibilité ;
- existence de cellules lymphoïdes fœtales à caractère suppressif ;
- sécrétion placentaire et fœtale de substances immunosuppressives comme l'uromoduline, protéine de l'urine de la femme enceinte.

## D. Embryogenèse, morphogenèse et période fœtale

Le développement du fœtus comporte deux périodes :
- la période embryonnaire qui dure environ deux mois et comprend l'embryogenèse qui est la mise en place des trois feuillets, la morphogenèse pendant laquelle le fœtus prend forme et l'organogenèse qui correspond à l'édification des principales ébauches des organes ;
- la période fœtale de maturation.

### 1. Période embryonnaire

#### a) Première semaine de l'embryon ou troisième semaine d'aménorrhée

La segmentation va jusqu'au stade de la morula (douze à seize blastomères). Au moment de l'implantation, l'œuf est au stade de blastocyste (ou blastocyte) avec un bouton embryonnaire (*voir plus loin, deuxième partie*).

#### b) Deuxième semaine embryonnaire ou quatrième semaine d'aménorrhée

Elle correspond à la formation du disque embryonnaire qui se différencie en deux feuillets :
- superficiel : l'ectoblaste ;
- profond : l'entoblaste.

Entre les deux apparaît la cavité amniotique bordée par l'amnios. À quinze jours, l'embryon mesure 1,5 mm.

### c) Troisième semaine embryonnaire ou cinquième semaine d'aménorrhée : la gastrulation

Le troisième feuillet, le mésoblaste, se différencie des deux précédents par migration de l'ectoblaste. À la fin de la gastrulation, les trois feuillets de l'embryon sont en place.

### d) Quatrième semaine embryonnaire ou sixième semaine d'aménorrhée : le début de l'organogenèse

L'ectoblaste donnera le tissu nerveux et l'épiderme. Le mésoblaste donnera le squelette, les muscles, le tissu conjonctif, l'appareil circulatoire et l'appareil rénal. L'entoblaste donnera les glandes digestives, les épithéliums digestif et respiratoire.

### e) Deuxième mois de la période embryonnaire

La morphogenèse et l'organogenèse (du 13$^{e}$ au 56$^{e}$ jour après la conception) se poursuivent avec l'édification des différentes ébauches des organes :

- au 32$^{e}$ jour d'aménorrhée, édification de la plaque neurale et de l'ébauche du cœur ;
- au 38$^{e}$ jour, édification du tube neural ;
- au 40$^{e}$ jour, ébauche du membre supérieur ;
- au 42$^{e}$ jour, édification de la placode optique, des poumons, du pancréas et de l'ébauche des membres inférieurs ;
- au 44$^{e}$ jour, édification de la placode olfactive ;
- au 56$^{e}$ jour, ébauche des mains ;
- au 63$^{e}$ jour, le cœur a quatre cavités.

## 2. Période fœtale de maturation

Les dimensions de l'embryon sont de 4,5 à 5 mm à 30 jours, de 17 mm à 45 jours, de 30 mm à 60 jours, de 30 cm à la fin du sixième mois.

Le poids de l'embryon et du fœtus évolue comme suit :

- à 3 mois : 45 g ;
- à 4 mois : 200 g ;
- à 6 mois : 1 000 g ;
- à 7 mois : 1 700 g ;
- à 8 mois : 2 500 g.

Il possède une forme humaine et un sexe reconnaissables à trois mois. À la fin du sixième mois, il dort 18 à 20 heures par jour et bouge le reste du temps.

Le fœtus est viable au-delà du sixième mois révolu, d'où la distinction légale instituée entre avortement et accouchement.

Les deuxième et troisième trimestres sont ceux des « finitions », de l'acquisition et de la mise en fonctionnement des grands appareils : digestif, pulmonaire, moteur, de la déglutition, la vision, l'ouïe (au septième mois, les bruits extérieurs sont perçus) et l'odorat. À mi-grossesse, apparaît l'émail dentaire. Les alvéoles pulmonaires se forment vers le cinquième mois. Les paupières sont ouvertes vers le septième mois.

Le fœtus *in utero* est sensible à la lumière, il suit des yeux une forte lumière orientée sur le ventre de sa mère. Il entend en premier lieu la voix de sa mère qu'il reconnaît parfaitement dès la naissance. Cette voix se transmet par voix osseuse le long de la colonne vertébrale jusqu'au bassin maternel. Il entend également les bruits extérieurs avec, semble-t-il, une prédilection pour les sons graves… Peut-être donc aussi la voix de son père. Dès la fin du sixième mois, le système sensoriel auditif du fœtus est fonctionnel. Les mouvements respiratoires sont nettement appréciables vers le huitième mois.

# II. Annexes du fœtus et leurs fonctions, le placenta

## A. Définition

- Les annexes du fœtus sont des formations temporaires destinées à protéger, à nourrir et à oxygéner l'embryon, puis le fœtus, durant la vie utérine. Pendant les neuf mois de la gestation, elles ont une évolution propre mais parallèle à celle du fœtus.
- Ces annexes comprennent le placenta et le cordon ombilical, les membranes de l'œuf et le liquide amniotique.

## B. Trophoblaste

*C'est la formation originelle du placenta.* L'œuf de cinq jours, appelé « blastocyste », est constitué d'une cavité à l'intérieur de laquelle s'individualise un amas de grosses cellules : le bouton embryonnaire. À l'extérieur, une couche de cellules trophoblastiques entoure la cavité. Elles se multiplient et se différencient en deux couches distinctes :

- une couche interne, le cytotrophoblaste ;
- une couche externe, le syncytiotrophoblaste qui sécrète l'hormone gonadotrope chorionique ou hCG. La différenciation des cellules et leur progression dans la muqueuse utérine aboutissent à l'individualisation, à un pôle utérin, d'une formation appelée « placenta » (trophoblaste ou chorion, d'où le mot « hémochorial » pour le placenta).

## C. Placenta et fonctions

### 1. Généralités

Le placenta est constitué de tissus maternels et *surtout fœtaux* d'où un aspect immunologique. Il est « l'organe directeur de la gestation ». Par ses activités polyvalentes, il est à la fois poumon, intestin, foie, rein, mais aussi glande endocrine productrice des hormones nécessaires au développement normal de la grossesse. Sa structure ainsi que les circulations sanguines maternelle et fœtale sont en contact sur la plus

grande surface possible tout en restant rigoureusement distinctes et non communicantes, du moins avant la délivrance.

Le placenta humain est :

- hémochorial : l'œuf pénètre dans la muqueuse utérine, le trophoblaste fraie son chemin dans l'endomètre jusqu'à éroder l'endothélium des vaisseaux utérins et se trouve ainsi directement en contact avec le sang maternel ;
- déciduale : la pénétration du trophoblaste jusqu'aux vaisseaux implique une destruction du tissu conjonctif utérin. L'expulsion du placenta hémochorial entraîne donc une hémorragie et la chute d'une partie plus ou moins importante de la muqueuse. Cette région, qui est éliminée avec le placenta à la délivrance, se nomme « caduque » ou « décidue » (du latin *decidus*, qui tombe) ;
- discoïde et pseudo-cotylédoné : par opposition aux placentas diffus occupant toute la cavité utérine, les villosités choriales sont groupées en petits amas ou cotylédons séparés par des cloisons incomplètes ;
- villeux et chorio-allantoïdien : la vascularisation des villosités placentaires est raccordée au système vasculaire de l'embryon par l'intermédiaire des vaisseaux allantoïdiens qui prendront le nom de « vaisseaux ombilicaux ».

## 2. Morphogenèse

- Elle s'étend du premier jour à la fin du quatrième mois de la grossesse et se divise en plusieurs parties.
- Le syncytiotrophoblaste (*voir plus haut*) va s'incorporer aux tissus maternels en émettant de véritables pseudopodes (colonnes syncytiales).
- Au sein de ces colonnes vont apparaître des lacunes (stade lacunaire : treizième jour). Ces colonnes sont disposées en travées radiaires (villosités primaires) autour de l'œuf.
- Elles provoquent, en les lysant, l'ouverture de vaisseaux maternels dont le contenu se répand dans les lacunes : c'est le début de la circulation maternelle placentaire.
- Vers le 18e jour, un axe avec des îlots vasculaires pénètre à son tour dans la villosité primaire : c'est le début de la circulation fœtale. La villosité primaire devient villosité secondaire.
- Parallèlement, ont lieu deux phénomènes : du « côté maternel », les différentes lacunes se réunissent pour former la chambre intervilleuse et, du « côté fœtal », les îlots vasculaires se raccordent au cœur fœtal par l'intermédiaire des vaisseaux allantoïdiens. Les villosités secondaires deviennent des villosités tertiaires qui peuvent évoluer de deux façons : soit elles pénètrent la paroi utérine et deviennent des villosités crampons, soit elles restent flottantes et sont les villosités libres.
- Entre le deuxième et le quatrième mois, la muqueuse utérine va s'individualiser en deux zones, la première, ou caduque basale, dont le rôle devient essentiel, et la seconde, ou caduque réfléchie, qui va dégénérer.
- Les villosités vont évoluer différemment selon qu'elles sont en face de l'une ou de l'autre de ces deux zones utérines : en face de la caduque basale, il y a croissance et développement du placenta et, en face de la caduque réfléchie, il y a dégénérescence.

- Cette transformation est achevée à la fin du quatrième mois et la cavité utérine est totalement effacée.
- La caduque basale se divise en deux parties : une couche spongieuse profonde et une couche compacte superficielle. Lors de la délivrance, le clivage s'effectuera entre les deux.
- Par ailleurs, le placenta est divisé en vingt à trente cotylédons par des cloisons.

## 3. Structure après le début du cinquième mois

Macroscopiquement, il a la forme d'un disque de 20 cm de diamètre et de 3 cm d'épaisseur au centre. Il pèse environ 500 g. Son insertion se fait le plus fréquemment vers le fond utérin. La face fœtale est lisse, tapissée par l'amnios. À travers, on distingue les vaisseaux placentaires. Le cordon ombilical s'insère le plus fréquemment au centre, mais cette insertion est parfois marginale, ou au niveau des membranes (vélamenteuse). La face maternelle est charnue et tomenteuse (c'est-à-dire villeuse). On distingue les différents cotylédons séparés par les septa.

## 4. Circulation placentaire

### a) Circulation proprement dite

- Le sang fœtal désaturé arrive par les deux artères ombilicales et aboutit à la villosité où il est oxygéné.
- Il est repris par des veines pour retourner au fœtus par la veine ombilicale.
- Du côté maternel, le sang en provenance des artères utérines se répand dans la chambre intervilleuse avant d'être repris par les veines utérines.

### b) Pressions

- Du côté maternel, la pression est de 70 à 80 mmHg au niveau de l'artère, de 10 à 15 mm au niveau de la chambre intervilleuse et de 10 mm au niveau de la veine. Ce gradient explique le mode de circulation.
- Du côté fœtal, la pression est de 30 à 35 mmHg (supérieure à celle de la chambre intervilleuse), ce qui maintient la turgescence de la villosité.

## 5. Fonctions

### a) Échanges respiratoires fœtaux

L'oxygène, dissous dans le plasma maternel, passe dans la circulation fœtale par diffusion. L'anhydride carbonique, dont la pression partielle est plus grande dans le sang fœtal, diffuse vers le sang maternel. Ces échanges sont liés au gradient de pression ainsi qu'aux modifications du pH (effets Bohr et Haldane).

### b) Échanges non gazeux

- *L'eau* : elle traverse le placenta par simple diffusion du fait d'un gradient osmotique. Les échanges entre mère et fœtus sont d'environ 3,5 L/h.
- *Les électrolytes* : le sodium et le chlorure suivent l'eau. Pour le potassium, le fer et le calcium, le placenta jouerait un rôle actif.

- *Les substrats* :
  - pour les hydrates de carbone, il s'agit d'un transfert facilité. Le placenta forme du glycogène dont il est l'organe de réserve. Le glucose est stocké dans le foie du fœtus ;
  - pour les protéines, la synthèse fœtale se fait à partir d'acides aminés maternels sous l'influence de stéroïdes. Le transfert est actif ;
  - pour les lipides, la stéroïdogenèse placentaire joue aussi un rôle essentiel.
- *Les vitamines* :
  - hydrosolubles B, C : le transfert est actif ;
  - liposolubles A, B, E : elles sont liées aux protéines et subissent le même processus. La vitamine K ne passe pas de la mère au fœtus.

### c) Rôle protecteur

Il est traditionnel de conférer au placenta un rôle protecteur vis-à-vis des xénobiotiques, ce qui a conduit au concept de barrière placentaire. En fait, il semble plus juste de parler de « filtre placentaire ».

- Les bactéries, parasites et virus peuvent passer la barrière placentaire à des degrés divers.
- Les anticorps maternels :
  - les IgG passent le placenta et protègent le fœtus par immunité passive ;
  - les IgM et les IgA ne passent pas, leur présence dans le sang fœtal est le résultat d'une synthèse active.
- Les médicaments : presque tous les médicaments pris par la mère atteignent des concentrations mesurables dans le sang fœtal. Une masse moléculaire inférieure à 1 000 Da, une forte liposolubilité, une absence d'ionisation, une faible liaison aux protéines plasmatiques et une configuration spatiale réduite sont autant de facteurs qui favorisent le passage transplacentaire des médicaments. L'activité de métabolisation des médicaments par le placenta est réelle mais faible, sauf quand la mère reçoit un inducteur enzymatique (phénobarbital, tabac, alcool, etc.). Les médicaments administrés et leurs métabolites peuvent être impliqués dans des phénomènes pathologiques (rétinoïdes, hormones masculinisantes, thalidomide, cytostatiques antifoliques, anticonvulsivants, anticoagulants notamment).

### d) Fonction hormonale

Cette fonction, essentielle dans le maintien de la grossesse, la croissance du fœtus et le mécanisme de l'accouchement, s'intègre dans une production materno-fœto-placentaire. On trouve :

#### ■ *Les hormones polypeptidiques*

- L'hormone gonadotrope chorionique, sécrétée par le syncytiotrophoblaste, a un rôle dans la transformation du corps jaune en corps jaune gravidique. Parmi ses autres rôles, citons la sécrétion de testostérone et la stimulation de la corticosurrénale fœtale. Elle jouerait un rôle stimulateur sur la production d'estrogènes à partir d'androgènes.
- L'hormone chorionique somatomammotrophique (HCS) aussi appelée « hormone lactogène placentaire » (HPL), sécrétée par le syncytiotrophoblaste, a un rôle lutéotrophique, lactogénique et mammotrophique.

■ *Les hormones stéroïdes*

- La progestérone : le placenta en est la source principale à partir du cholestérol maternel dès la sixième semaine.
- Les estrogènes, en particulier l'estriol (E3) dont la synthèse met en jeu l'ensemble de l'unité fœto-placentaire.

Les fonctions métabolique et endocrine sont étroitement liées à celle du fœtus (dépendance) d'où la notion d'unité fœto-placentaire.

### 6. Cordon ombilical

Dès la quatrième semaine, l'extension très importante de la cavité amniotique remplie de liquide détermine la constitution du cordon ombilical sur la face ventrale de l'embryon. À partir du quatrième mois, le cordon est constitué de deux artères et d'une veine entourées d'une substance gélatineuse appelée « gelée de Wharton ».
Au cours des deux derniers trimestres de la grossesse, le cordon voit son diamètre et sa longueur s'accroître. À terme, il mesure de 30 à 70 cm de long et a un diamètre de 1 à 2 cm.

## D. Cavité et liquide amniotiques

- La cavité amniotique apparaît vers le dixième ou le douzième jour et contient le fœtus qui flotte dans le liquide amniotique. Elle est limitée par deux membranes : l'amnios interne et le chorion, sauf au niveau de l'insertion placentaire dont elle n'est séparée que par l'amnios. Ces membranes jouent un rôle d'échange sélectif et sont une protection contre les chocs et les infections. Elles sont translucides et résistantes.
- Le liquide amniotique, clair, aqueux, contenu dans la cavité amniotique, est un milieu complexe. Son évolution et son renouvellement sont constants au cours de la grossesse.

### 1. Double origine du liquide amniotique

- Il est sécrété par les cellules amniotiques et dérive du sang maternel. Au cours des premiers mois de la grossesse, l'embryon est appendu par son cordon ombilical dans ce liquide qui joue un rôle de coussin protecteur. Le liquide absorbe les chocs, empêche l'adhérence de l'embryon à l'amnios et permet les mouvements fœtaux. L'eau amniotique se renouvelle environ toutes les trois heures.
- Son origine est principalement fœtale et en premier lieu rénale.

La miction fœtale est, dès la dixième semaine, de 0,7 ml/h. À terme, le fœtus urine toutes les trois heures avec un volume mictionnel de 450 ml par jour. À une date se situant probablement au cinquième mois, il déglutit son liquide amniotique à raison de 400 à 450 ml par jour, ce qui représente à peu près la moitié de la quantité totale de liquide amniotique. Lorsque le fœtus est incapable d'avaler (atrésie de l'œsophage, anencéphalie), il se produit un excès de liquide amniotique (hydramnios). Dans les conditions normales, le liquide amniotique est absorbé par

voie intestinale dans la circulation sanguine et passe dans le sang maternel par l'intermédiaire du placenta. À la fin de la grossesse et pendant l'accouchement, l'amnios et le chorion aident à la dilatation du canal cervical. Le liquide amniotique possède aussi un rôle nutritif.

## 2. Composition

- Il est constitué d'eau (96 %), d'électrolytes, de protéines de petites masses moléculaires dont l'alpha-fœtoprotéine (AFP), de formation exclusivement fœtale. L'alpha-fœtoprotéine, lorsqu'elle est présente à des concentrations élevées, est un très bon marqueur des malformations fœtales touchant le tube neural. L'AFP passe dans le sang maternel.
- Certains lipides sont en suspension, tels les phospholipides tensioactifs produits par le poumon fœtal qui sont le reflet de la maturation pulmonaire.
- De nombreuses hormones y sont détectables, d'origine fœtale ou placentaire.
- Des constituants biochimiques sont présents dans le liquide amniotique :
  - la valeur de la bilirubine est fonction du terme de la grossesse : une élévation peut traduire un trouble de la déglutition et faire rechercher une malformation fœtale, notamment digestive. Au cours d'une grossesse normale, la bilirubinamnie est relativement faible. L'absence de bilirubinamnie traduit un âge gestationnel supérieur à 36 semaines. Au cours d'une grossesse avec incompatibilité fœto-maternelle, l'hémolyse du sang fœtal par les anticorps maternels entraîne une production excessive de bilirubine que le foie fœtal immature ne parvient pas à conjuguer. Il en résulte une hyperbilirubinémie non conjuguée dont le liquide amniotique est une voie d'élimination. Il existe une relation incontestable entre la sévérité de la maladie hémolytique et la concentration de la bilirubine amniotique ;
  - la créatinine provient du catabolisme de la créatine du muscle. La créatininamnie reflète l'accroissement de la masse musculaire et la maturation de la fonction rénale fœtale. Elle représente donc un des critères de la maturité fœtale ;
  - l'acide urique et l'urée sont à des concentrations très supérieures à celles qui sont trouvées dans le plasma du fœtus ou de sa mère, tandis que le glucose y est très inférieur.
- L'étude des constituants du liquide amniotique prélevé par amniocentèse permet l'étude chromosomique des cellules fœtales et la suspicion de certaines malformations d'organes.

## 3. Méconium

Le méconium est la substance fécaloïde qui s'accumule dans l'intestin au cours de la vie utérine du fœtus et qui est expulsée à la naissance. C'est une masse visqueuse formée surtout de résidus cellulaires et de sécrétions digestives. On y trouve des sels minéraux, des lipides et du cholestérol, des sels biliaires, de la bilirubine. La stercobiline y est absente, car l'intestin est stérile et la réduction bactérienne n'a pu s'opérer.

# III. Physiologie endocrinienne de la grossesse et de l'unité fœto-placentaire

L'équilibre hormonal de la grossesse est un facteur important pour le développement normal de la gestation. Les hormones intervenant dans cet équilibre proviennent aussi bien du fœtus que du placenta (unité fœto-placentaire). Elles agissent sur la nidation au sein d'une muqueuse utérine réceptive, sur le maintien de la grossesse, le développement fœtal, le déclenchement du travail et la lactation. La grossesse présente deux phases hormonales en fonction de l'origine des sécrétions :

- la première phase est placento-ovarienne, au premier trimestre. Les problèmes pratiques sont essentiellement diagnostiques ;
- la deuxième phase, jusqu'à la fin de la grossesse, correspond à l'unité materno-fœto-placentaire et, en pratique, elle correspond à la surveillance de l'évolution de la grossesse.

Les variations de certaines hormones pendant le cycle menstruel, pendant la grossesse et pendant le *post-partum* sont indiquées dans les *figures 2, 3 et 4*.

## A. Hormones et nidation

### 1. Conditions hormonales maternelles de l'implantation

Sur la muqueuse utérine sensibilisée par les estrogènes (induction de récepteurs à la progestérone), la progestérone joue un rôle fondamental dans la nidation du blastocyste et son maintien.
Le rôle contraceptif, ou plutôt contragestif, du médicament mis au point par le professeur Baulieu, le RU 486 ou Mifégyne®, s'explique par son action antirécepteurs de la progestérone. Il interrompt la grossesse, après une dose orale unique de 600 mg, à condition d'être employé au plus tard le 41e jour d'aménorrhée. L'expulsion de l'œuf se fait dans les deux jours qui suivent.

### 2. Rôle endocrinien du blastocyste

Le blastocyste joue un double rôle :

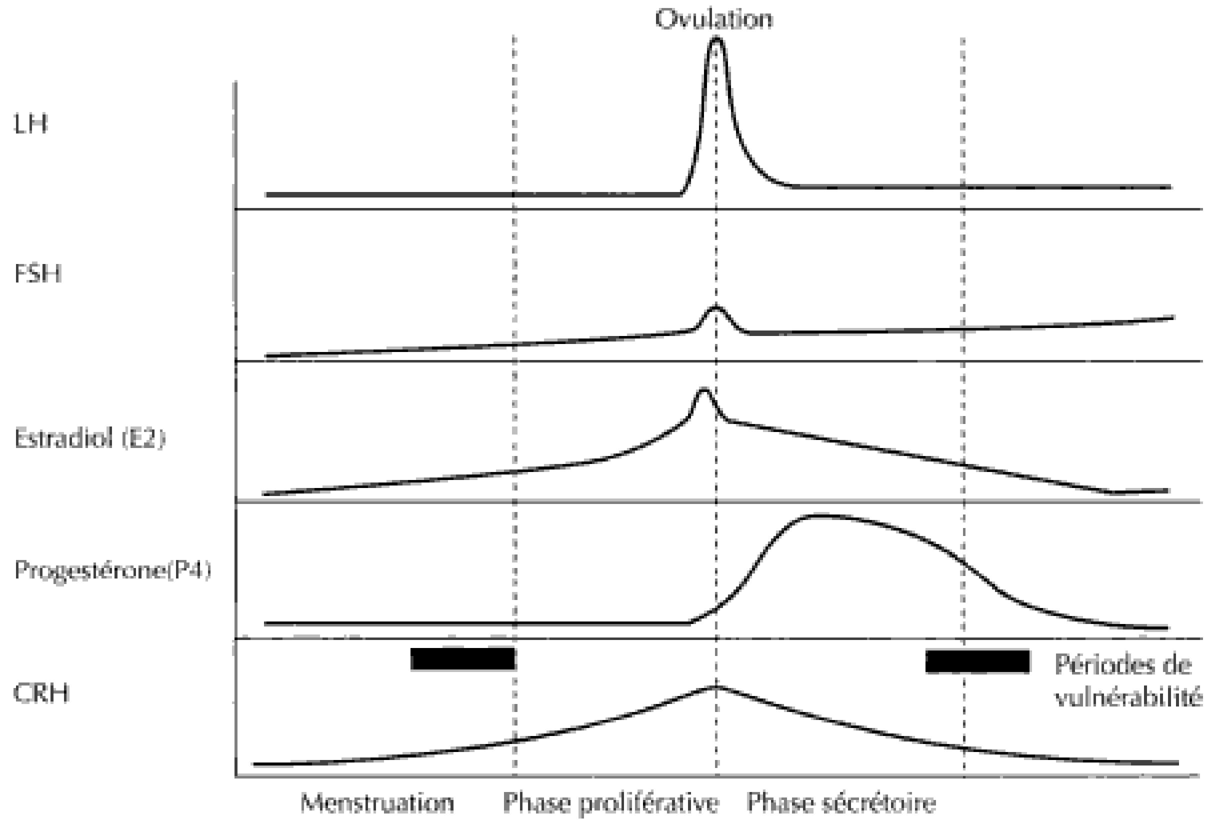
- rôle dans la sécrétion de stéroïdes, en particulier d'estradiol, qui faciliteraient l'implantation en contribuant à induire la réaction déciduale ;
- rôle dans le maintien du corps jaune, à la fois par effet lutéotrope et en prévenant la lutéolyse (destruction du corps jaune). La sécrétion d'hormone chorionique gonadotrope (hCG) est très précoce, probablement avant même l'implantation. Le blastocyste intervient en limitant la sécrétion par l'utérus d'une prostaglandine lutéolytique F2alpha.

## B. Hormones et sécrétions de la phase placento-ovarienne (premier trimestre)

Le dosage de certaines hormones et protéines présente un intérêt diagnostique ou pronostique. On distingue plusieurs sécrétions.

## 1. Sécrétions du corps jaune gravidique ou stéroïdes sexuels (estradiol, progestérone, 17-hydroxyprogestérone)

Pour ces hormones, les valeurs sont toujours supérieures à celles que l'on observe dans un cycle menstruel normal. Ces modifications peuvent être vérifiées dès la quatrième semaine d'aménorrhée. Dès la sixième semaine, le placenta devient, après le corps jaune, la source principale de progestérone synthétisée à partir du cholestérol maternel. Cette hormone joue un rôle essentiel dans l'établissement et le maintien de la gestation.




Chrousos G.P. *et al.* Ann Intern Med 1998 ; 129 : 229-240

**Figure 2.** Changements hormonaux et périodes de vulnérabilité accrues aux sautes d'humeur et aux phénomènes auto-immuns pendant le cycle menstruel

## 2. Sécrétions ovulaires

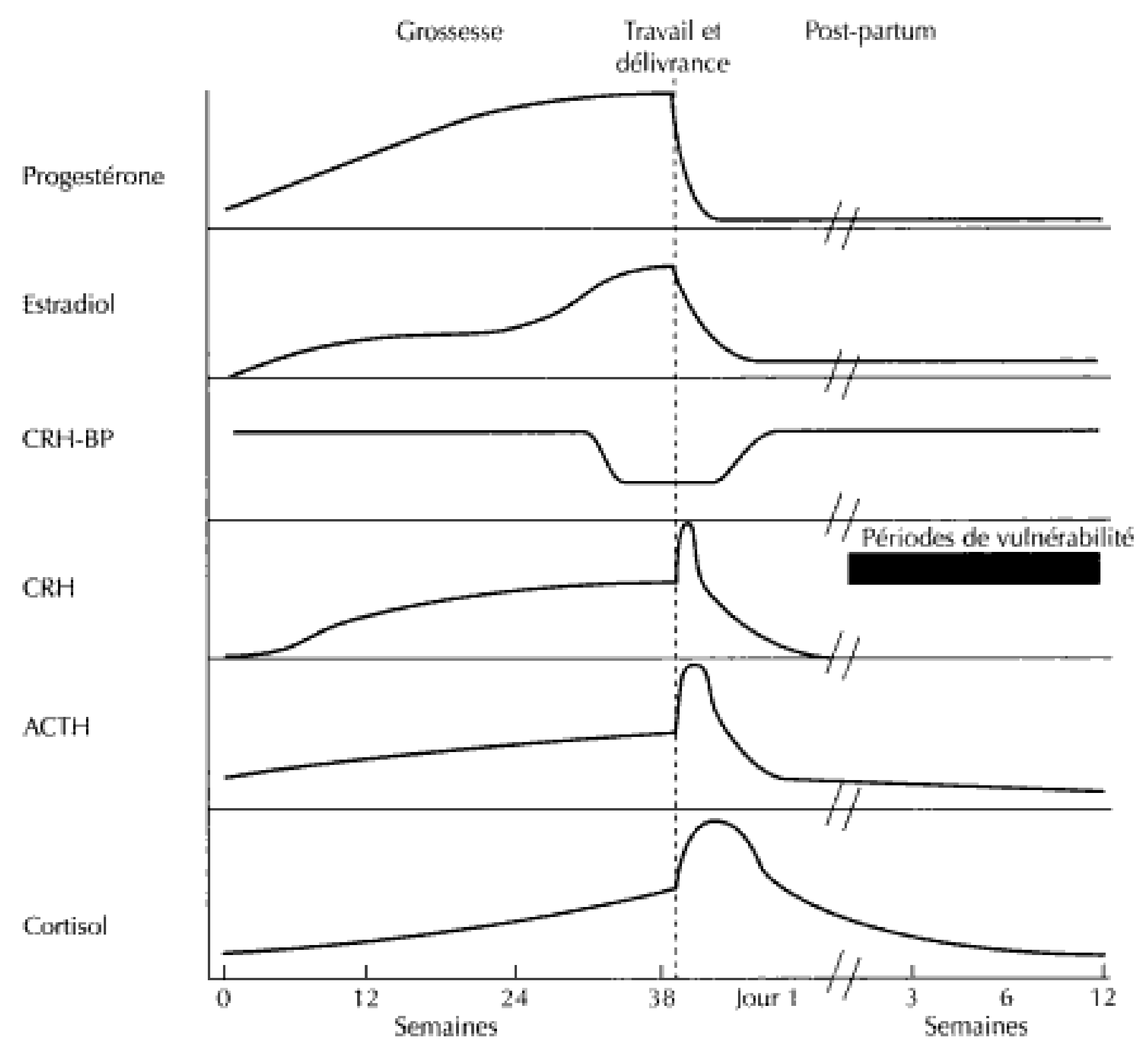
Le trophoblaste a une activité sécrétoire importante et incomplètement connue. Dans ce groupe d'hormones et de protéines, on trouve :

### a) Le facteur de grossesse immunosuppresseur précoce ou EPF

Sa détection dans le sérum maternel peut être positive moins de 24 heures après un rapport fécondant. Mais son dosage est difficile et sa spécificité insuffisante.

### b) L'hormone chorionique gonadotrope (hCG)

C'est une glycoprotéine formée de deux sous-unités, $\alpha$ commune à la TSH (thyréostimuline ou *thyroid stimulating hormone*), la FSH et la LH, et $\beta$ spécifique, malgré 82 % de communauté antigénique avec la chaîne $\beta$ de la LH.
Sécrétée par le trophoblaste, sept jours après la fécondation et dès l'implantation de l'œuf, sa concentration double tous les deux jours environ jusqu'à la dixième semaine.




Chrousos G.P. *et al.* Ann Intern Med 1998 ; 129 : 229-240

**Figure 3.** Changements hormonaux et périodes de vulnérabilité accrues aux sautes d'humeur et aux phénomènes auto-immuns pendant la grossesse et le post-partum

Après quoi, elle diminue puis reste en plateau jusqu'à la fin de la grossesse. L'évolution de l'hCG est identique dans le sang et l'urine. La β-hCG dans le sang évolue comme l'hCG totale. Après la dixième semaine, le placenta prend le relais pour sécréter les hormones nécessaires à la grossesse : HPL (hormone placentaire lactogène) et glycoprotéine SP1 (voir *plus loin*). Les propriétés physiologiques de l'hCG sont :

- une action lutéotrophique et de stimulation de la transformation du corps jaune cyclique en corps jaune gestatif ;
- un rôle dans la différenciation gonadique mâle et la sécrétion de testostérone ;
- un rôle immunodépresseur maternel.

Grâce à sa synthèse dès le début de la nidation (dixième jour), elle permet le diagnostic précoce de grossesse. Le dosage de l'hCG permet de :

- préciser l'existence d'une grossesse débutante (autotest urinaire) ;
- suivre l'évolution de la grossesse, sa bonne vitalité et suspecter une localisation ectopique ;
- dépister une anomalie trophoblastique : môle hydatiforme (œuf pathologique avec un trophoblaste dystrophié, une disparition de la vascularisation, la mort précoce et la disparition de l'embryon) ;

- enfin, dans le cadre du dépistage des anomalies chromosomiques, le dosage entre la 15e et la 17e semaine d'aménorrhée, couplé au dosage d'un deuxième marqueur comme l'alpha-fœtoprotéine, permet de réaliser le calcul d'un rapport de risque. Cependant, ce dosage n'a qu'une valeur d'orientation diagnostique.

### c) La *specific pregnancy β1-globulin* ou SP1 ou SPA ou PSBG

C'est une β1-globuline, absente chez la femme non enceinte, de fonction inconnue, synthétisée par le syncytiotrophoblaste. Elle est détectable comme l'hCG dès le huitième jour qui suit la fécondation. Sa concentration double tous les deux ou trois jours et continue à augmenter jusqu'au terme. Son dosage encore difficile serait intéressant pour le suivi des grossesses induites par hCG. Au cours du troisième trimestre des grossesses à risque, elle est le reflet d'un bon fonctionnement placentaire.

### d) L'hormone chorionique somatomammotrophique (HCS) ou hormone lactogène placentaire (HPL)

C'est une hormone polypeptidique dont la structure est très voisine de celle de l'hormone de croissance, de l'hCG et de la prolactine. Elle est sécrétée par le syncytiotrophoblaste et est décelable dans le plasma de la femme dès la troisième semaine. Sa sécrétion suit une courbe ascendante régulière atteignant un maximum en fin de grossesse. Elle diffère donc de celle de l'hCG. Sa production dépend de la masse totale du placenta et sa concentration dans le sang augmente régulièrement de la dixième à la trentième semaine de 1 à 10 µg/L. Elle atteint un plateau vers la 34e semaine et diminue jusqu'à l'accouchement.
L'HPL est l'hormone qui apprécie le mieux la trophicité placentaire. Les dosages doivent être effectués deux fois par semaine au cours du troisième trimestre pour les diagnostics d'hypotrophie fœtale et le dépistage de souffrance fœtale. Parmi les effets de l'HCS qui est lutéotrope, lactogène, mammotrophique et somatotrope, c'est l'effet somatotrope qui est le plus intéressant. Les capacités métaboliques de l'HCS portent sur :

- une synthèse protéique accrue avec bilan azoté positif ;
- une lipogenèse accrue directement et par hyperinsulinisme ;
- une lipolyse accrue avec libération d'acides gras libres utilisés préférentiellement par les tissus de la mère.

Ainsi, une de ses fonctions majeures est d'assurer au fœtus un apport énergétique suffisant et constant sous la forme de glucose. L'ensemble s'inscrit dans un effet anabolique général.

### e) L'AFP ou alpha-fœtoprotéine

Elle est synthétisée par le foie fœtal et n'est détectable dans le sang maternel que tardivement. Son dosage est utile pour la recherche d'anomalies de la fermeture du tube neural entre les 13e et 17e semaines d'aménorrhée.
L'interprétation combinée des valeurs des concentrations plasmatiques d'AFP, d'hCG et d'estriol non conjugué permet le calcul d'un risque statistique de trisomie 21 ajusté à l'âge maternel.

### f) Les pregnancy-associated plasma protein a et b ou PAPP

#### g) Les protéines placentaires ou PP

Elles seraient produites par le syncytiotrophoblaste à partir de la dixième semaine d'aménorrhée.

## C. Hormones de l'unité materno-fœto-placentaire (deuxième et troisième trimestres)

### 1. Généralités

Le placenta est un organe endocrine sécréteur de protéines (hCG, HLP) et de stéroïdes (estrogènes, progestérone). Mais il ne peut effectuer la synthèse du cholestérol à partir d'acétate et ne peut pas transformer la prégnénolone ou la progestérone en androgènes. Il ne peut donc produire des estrogènes qu'à partir des androgènes fœtaux ou maternels. Cela conduit à considérer l'unité fœto-placentaire comme un ensemble dont le placenta est le centre, entouré du fœtus et la mère.

### 2. Évolution

La concentration des hormones maternelles s'élève au cours de la gestation et on observe plus particulièrement les variations :

- de la progestérone. Elle est d'origine principalement placentaire, à partir de la sixième semaine de gestation, mais le corps jaune gravidique continue d'en sécréter jusqu'à terme. Sa concentration s'élève jusqu'à la 36$^{e}$ semaine, puis se maintient en plateau ;
- des estrogènes d'origine essentiellement placentaire. Leur valeur dans le sang maternel s'élève progressivement pour atteindre pour l'estrone (folliculine ou E1) et l'estradiol (E2) libres, cent fois les valeurs observées au cours du cycle menstruel.

L'origine ovarienne des estrogènes et de la progestérone est négligeable. Pour ces hormones, la concentration s'élève rapidement dès que le corps jaune devient gravidique. Elle chute brutalement avant la parturition, la progestérone avant les estrogènes.

### 3. Action au cours de la gestation

- En synergie avec les estrogènes, la progestérone assure la trophicité de l'endomètre utérin, diminue la motricité spontanée du myomètre, prépare la glande mammaire à l'élaboration du lait lors de la parturition. Associée aux estrogènes, elle inhibe la libération des gonadotropines – ou gonadotrophines – hypophysaires et bloque l'ovulation.
- Les estrogènes seuls ont un effet abortif variable suivant les espèces animales, mais pratiquement nul chez la femme. Ils peuvent augmenter l'activité contractile du myomètre. Ils exercent un effet antidopamine qui favorise la sécrétion de prolactine.

### 4. Intérêt des dosages

- La *progestérone, l'estrone et l'estradiol* (E1 et E2) sont des indices de la fonction placentaire.

- L'*estriol plasmatique* (E3) est le plus abondant. Sa courbe est peu pentue jusqu'à la 34ᵉ semaine, puis abrupte jusqu'au terme. La pente peu importante est le témoin des croissances conjuguées du placenta et des surrénales fœtales, la seconde partie reflète le développement important des surrénales en fin de grossesse.

## 5. Autres hormones

- La *relaxine*, proche de l'insuline et des facteurs de croissance, est sécrétée par le corps jaune. Elle produit un relâchement de la symphyse pubienne chez le cobaye lors de la parturition, mais on connaît mal son action chez la femme.
- La *prolactine* est sécrétée en quantité importante au cours de la gestation. Mais la lactation ne peut apparaître, car il y a blocage des récepteurs à la prolactine sous l'effet de la progestérone.

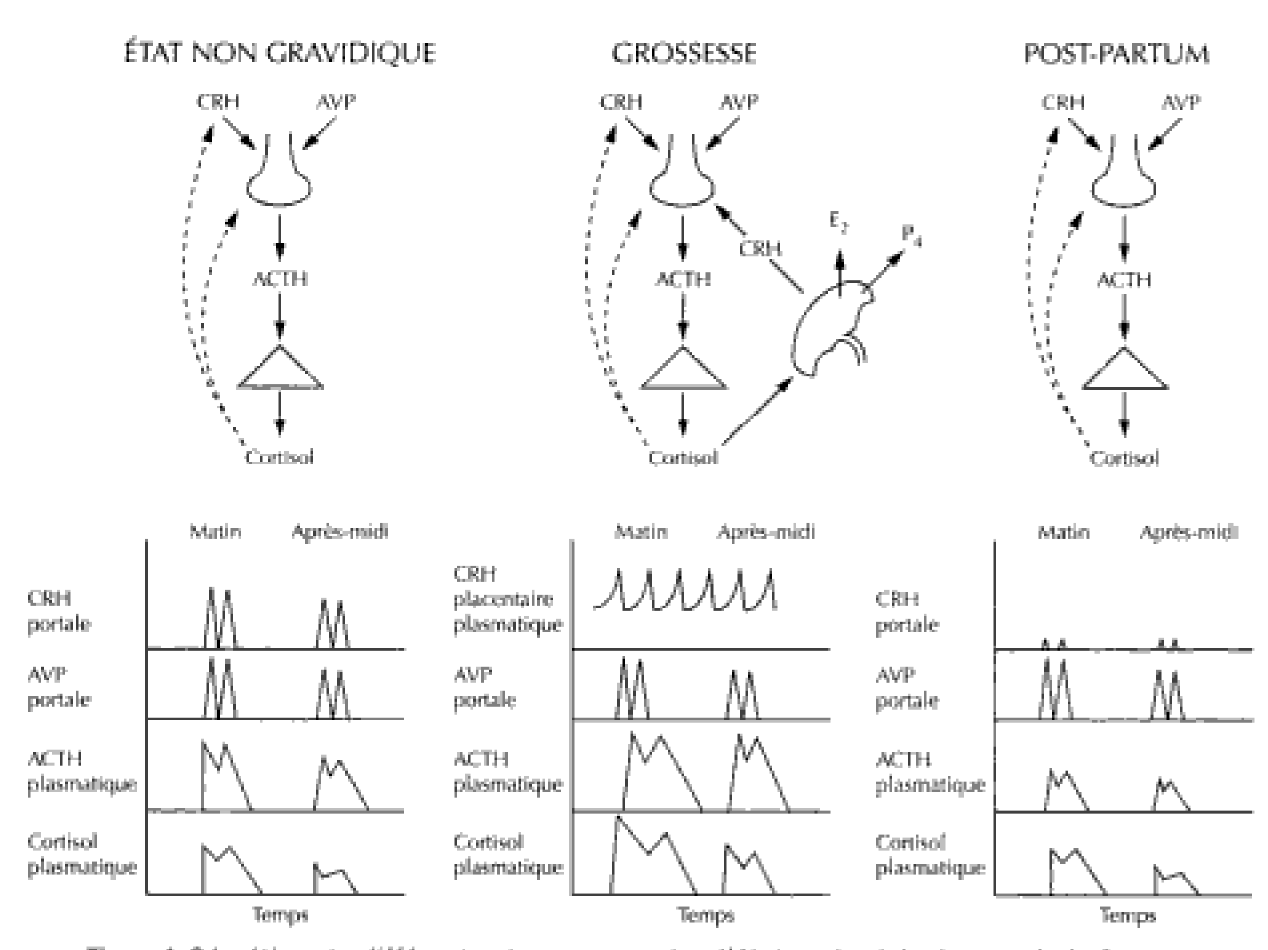



**Figure 4.** Sécrétion de différentes hormones selon l'état « physiologique » de la femme avant, pendant et après la grossesse.
Chrousos G.P. *et al.* Ann Intern Med 1998 ; 129 : 229-240

# D. Hormones dans l'accouchement (ou parturition) et *post-partum*

## 1. Accouchement

C'est l'évacuation du fœtus à terme et du placenta avec trois phases :
- contractions utérines s'accompagnant d'une dilatation cervicale ;
- expulsion du fœtus ;
- élimination du placenta.

Le déterminisme serait hormonal, mais les mécanismes qui commandent l'accouchement sont encore mal connus. Plusieurs hormones interagissent au niveau du corps et du col utérin et elles déclencheraient le travail et l'accouchement. Les phénomènes pourraient, schématiquement et de manière incomplète, être les suivants (Smith R. Le déclenchement de l'accouchement, *Pour la science*, 1999 : 259 : 56-63) :

- pendant la grossesse, l'utérus est relâché, ses cellules musculaires lisses étant « indépendantes » les unes des autres et le col étant « scellé » par un anneau rigidifié par des fibres de collagène. Cela est dû à la progestérone placentaire ;
- à partir de la douzième semaine de la gestation, le placenta sécrète de la CRH (corticolibérine) également appelée « CRF » (*corticotropin releasing factor*) dont la concentration augmente de façon exponentielle dans le sang maternel (sa valeur entre la seizième et la vingtième semaine pourrait permettre de connaître assez correctement la date de l'accouchement, qui est plus précoce quand la concentration est plus élevée). La CRH provient aussi de l'hypothalamus du fœtus ;
- la CRH déclenche la libération d'hormone corticotrope ou ACTH (*adrenocorticotropic hormone*) par l'hypophyse fœtale et cette hormone conduit la corticosurrénale fœtale à produire du cortisol ;
- le cortisol assure la maturation finale des poumons du fœtus avec la production des substances qui en élimineront l'eau et leur permettront de se déployer. Le cortisol et de nombreux autres facteurs placentaires entretiennent aussi la production placentaire de CRH ;
- la surrénale fœtale produit aussi, sous l'influence de la CRH et de l'ACTH, du sulfate de déhydroépiandrostérone (DHEA) que les enzymes placentaires transforment en estrogènes nécessaires au déclenchement du travail ;
- la concentration des estrogènes s'accroît donc, ce qui entraîne la sécrétion par le myomètre d'une protéine, la connexine, qui forme des jonctions entre les cellules musculaires, leur permettant de se contracter en phase. En même temps, les estrogènes entraînent le myomètre à produire des récepteurs à l'ocytocine, hormone posthypophysaire utérotonique. L'utérus se prépare au travail qui commencera quand les forces activatrices des contractions (dues aux estrogènes et aux autres composés) l'emporteront sur celles qui les inhibent (dues à la progestérone) ;
- au niveau du col utérin, la production de prostaglandines, sous l'influence de la CRH et des estrogènes, induit la formation d'enzymes qui digèrent les fibres de collagène et permettent la dilatation du col et son ouverture ;
- la CRH accroît les contractions dues à l'ocytocine.

En résumé, l'utérus et son col se modifieraient et le travail commencerait lorsque des concentrations critiques de CRH, d'estrogènes, de prostaglandines et d'autres agents seraient atteintes.

D'autres facteurs interviennent : la taille du fœtus qui étire l'utérus et libère des prostaglandines, et l'état nutritionnel fœtal.

Une fois l'accouchement commencé, l'utérus intervient sur sa propre contraction. Celle-ci dilate le col et stimule des récepteurs d'étirement de la paroi. Des influx nerveux gagnent la moelle épinière et entraînent en retour une contraction utérine. Ces influx montent également jusqu'à l'encéphale et agissent sur les neurones hypothalamiques qui stimulent le lobe postérieur de l'hypophyse et libèrent l'ocytocine qui entraîne de fortes contractions utérines. Cette dernière agirait peut-être aussi en facilitant la synthèse des prostaglandines.

Les prostaglandines $PGE_2$ et $PGF_2\alpha$ peuvent déclencher des contractions à tous les stades de la grossesse et donc peuvent entraîner un accouchement prématuré. Leur administration déclenche les contractions utérines et l'expulsion du fœtus quel que soit le stade de la grossesse. Elles sont présentes dans le liquide amniotique, le sang et les urines maternelles, et leur concentration augmente pendant les dernières semaines. Lorsque le travail est en cours, les perturbations mécaniques et l'hypoxie favorisent la libération d'acide arachidonique et une synthèse accrue de prostaglandines : le travail serait donc autoentretenu.

Le col subit une dilatation graduelle et progressive jusqu'à ce que la filière génitale soit assez grande pour permettre le passage de la tête du fœtus. Des vagues successives de contractions abdominales et utérines propulsent le fœtus à travers cette filière. Plus le col se dilate, plus l'utérus et les parois abdominales se contractent, et plus la sécrétion hormonale, surtout d'ocytocine, est importante. La tête sort en premier dans 95 % environ des naissances normales. Dans les 5 % restants, les fesses sortent en premier : c'est la présentation par le siège.

### 2. Post-partum

Les contractions du *post-partum* séparent les connexions entre l'utérus et le placenta et favorisent la constriction des vaisseaux utérins. En l'absence de contractions utérines survient une hémorragie. L'utérus reprend sa taille normale au bout d'un mois.

L'aménorrhée cesse au bout de cinq ou six semaines chez la femme qui n'allaite pas : c'est ce que l'on appelle le « retour de couches ». Elle est prolongée chez la femme qui allaite. On peut expliquer cela par un effet inhibiteur direct de l'hyperprolactinémie sur les fonctions ovariennes et hypothalamiques où elle supprime la libération pulsatile de LH et inhibe l'effet de rétrocontrôle positif des estrogènes.

L'hypophyse est également impliquée en étant probablement encore sous l'effet de la freination par les stéroïdes. Cet état dure quatre semaines, même en l'absence de lactation.

L'inhibition de l'ovulation au cours de la lactation est également nerveuse. Les influx nerveux du mamelon stimulent les β-endorphines hypothalamiques, d'où une inhibition de la pulsatilité de la libération de la LH-RH, et donc de la LH, et une stimulation des cellules à prolactine.

## E. Lactation

Elle nécessite une préparation hormonale, réalisée pendant la gestation, et l'intervention du nouveau-né. L'hypophyse joue un rôle fondamental car l'hypophysectomie l'empêche ou l'arrête. Pendant la gestation, la glande mammaire se développe. Les extrémités des canaux s'élargissent en alvéoles dont les cellules vont élaborer le lait. La mammogenèse dépend de l'action :

- des stéroïdes sexuels : les estrogènes provoquent une activité mitotique qui conduit à une expansion des canaux galactophores et la synergie estrogènes-progestérone est nécessaire à la réponse lobulo-acineuse de la glande mammaire ;
- des hormones lactogènes : l'HLP, l'hormone de croissance et la prolactine qui peut, en l'absence de tout stéroïde ovarien, induire une mammogenèse. D'autres

substances responsables de multiplication cellulaire (insuline, glucocorticoïdes) interviennent sur le tissu mammaire sensibilisé par les hormones sexuelles.
La sécrétion lactée est préparée par les bouleversements hormonaux qui précèdent et accompagnent l'accouchement. La concentration élevée de la progestérone bloque l'induction de la lactation tout en favorisant le développement de la glande mammaire. La chute brutale de la progestérone lors de la délivrance lève cette inhibition, tandis que le pic de glucocorticoïdes favorise la production de lait en amplifiant l'action de la prolactine.
À ces phénomènes hormonaux s'ajoutent des phénomènes nerveux : la stimulation de l'arc réflexe neuroendocrinien par les premières mises au sein amorce la vidange mammaire. Ces influx nerveux inhiberaient aussi la sécrétion des neurones dopaminergiques et des neurones sécréteurs du PIF (*prolactin inhibiting factor*) dans l'hypothalamus, stimulant ainsi la sécrétion de prolactine.
L'expulsion du lait est assurée directement par la succion par réflexe tacto-hypothalamo-hypophysaire. Elle provoque la sécrétion d'ocytocine qui contracte les cellules myoépithéliales de la glande mammaire. Au cours de la tétée, l'ocytocine est libérée de manière pulsatile provoquant à chaque libération une éjection de lait. Pendant l'allaitement, les neurones à ocytocine présentent des décharges en rafales (*bursts*) séparées par des intervalles de quelques minutes. C'est à la fin de chaque *burst* que survient la décharge d'une « bouffée » d'ocytocine entraînant à la périphérie l'éjection du lait.

# IV. Modifications de l'organisme maternel au cours de la grossesse

## A. Modifications biologiques et physiologiques

Il faut en tenir compte lors de la prescription des médicaments.

### 1. Modifications hémodynamiques

Le débit cardiaque augmente de 30 à 40 %. Il est maximal vers la 24$^{e}$ semaine et diminue à terme.
La pression artérielle diminue de 15 à 20 mmHg. La diminution de la pression diastolique associée à une augmentation de la masse sanguine est expliquée par une diminution des résistances vasculaires périphériques, peut-être par intervention de la relaxine et de prostaglandines vasodilatatrices, probablement sous contrôle de la progestérone. Le flux sanguin est plus faible au niveau des membres inférieurs.

### 2. Modifications sanguines

La masse sanguine augmente essentiellement par accroissement du volume plasmatique (plus 40 %), qui est maximal entre la 30$^{e}$ et la 34$^{e}$ semaine. Il existe donc

une hémodilution physiologique. La rétention d'eau est de 4 à 6 litres, dont 1,5 litre pour le secteur plasmatique.
On note physiologiquement une hyperleucocytose, les protéines et l'albumine diminuent, les lipides sont considérablement augmentés. La vitesse de sédimentation est augmentée.
Il existe aussi une augmentation de certains facteurs de coagulation : fibrinogène, facteurs VII, X et VIII ainsi qu'une petite diminution de l'activité fibrinolytique et de l'antithrombine III. Au moment de l'accouchement, le fibrinogène et le facteur VIII diminuent légèrement alors que l'activité fibrinolytique augmente.

## 3. Modifications de la fonction rénale

Le flux plasmatique rénal augmente de 25 à 30 % et reste élevé jusqu'à la fin de la grossesse.
La filtration glomérulaire augmente proportionnellement plus que le flux plasmatique, d'où une diminution des valeurs de la créatinine et de l'uricémie. On note une augmentation de l'excrétion urinaire des acides aminés et du glucose. De même, la filtration glomérulaire des médicaments est augmentée. Les infections urinaires peuvent être fréquentes et souvent asymptomatiques.

## 4. Modifications ventilatoires

La femme enceinte hyperventile (augmentation de 50 à 60 %) d'où une hypocapnie à 32 mmHg (normale : 40 mmHg environ).

## 5. Modifications gastro-intestinales

Elles sont, au moins en partie, la conséquence de la forte élévation de la progestéronémie. Par son action myorelaxante, elle favorise le reflux gastro-œsophagien, le pyrosis et la constipation, pathologies très fréquentes au cours de la grossesse. De la même manière, la progestéronémie est impliquée dans les troubles veineux, les varices et les hémorroïdes.
Les modifications gastro-intestinales influencent le devenir des médicaments. L'augmentation des temps de séjour gastrique et intestinal favorise globalement l'absorption des principes actifs.
Sous l'action des estrogènes, une cholestase s'installe. L'élimination par voie biliaire de la rifampicine, par exemple, est ralentie.

## 6. Balance sodée

Le bilan sodé est positif de 500 à 700 mmol en raison de la présence du fœtus et de l'augmentation des espaces extracellulaires.

## 7. Métabolisme des hydrates de carbone

Dans les premiers mois, la glycémie à jeun diminue, l'insulinémie augmente et son action sur le métabolisme des hydrates de carbone est renforcée par celle des estrogènes et de la progestérone. Dans la seconde moitié de la grossesse, l'antagonisme de l'insuline et de l'HCS, et plus accessoirement celui du cortisol et de la prolactine, entraîne une résistance à l'insuline. Il existe souvent une glycosurie sans hyperglycémie par simple augmentation du seuil de filtration glomérulaire.

## B. Variations hormonales non spécifiques

### 1. Hormones hypophysaires

On constate une augmentation de 20 % du poids de l'hypophyse. La concentration plasmatique de prolactine subit une élévation considérable. Les valeurs de FSH, de LH et de l'hormone de croissance restent très basses ou indécelables, celles d'ACTH et de TSH sont peu ou pas augmentées.

### 2. Hormones surrénaliennes

On observe une augmentation des concentrations plasmatiques de cortisol matinal total ou libre, d'aldostérone, de testostérone et d'androstènedione.

### 3. Hormones thyroïdiennes

L'augmentation de la concentration plasmatique de thyroglobuline (TBG, *thyroxine binding globulin*) sous l'action des estrogènes entraîne un accroissement des concentrations sériques de T4 totale et, à un moindre degré, de T3 totale. Les concentrations de T3 libre, de T4 libre et de TSH ne sont pas modifiées.

### 4. Protéines vectrices des hormones

Elles augmentent sous l'influence des estrogènes circulants.

## C. Modifications générales et locales

### 1. Aménorrhée

L'aménorrhée est en général le premier signe de la grossesse. Pour autant, toutes les aménorrhées ne sont pas dues à une grossesse et, à l'inverse, des métrorragies en début de gestation peuvent rendre difficile ce signe d'interprétation.

### 2. Courbe de température

La prolongation du tableau lutéal caractérise également le début de la grossesse. Le corps jaune devient gravidique. L'élévation de température au-dessus de 37 °C dure plusieurs semaines.

### 3. Prise de poids

C'est un signe important et sa surveillance régulière est obligatoire. Elle doit être modérée (10 à 12 kg en fin de grossesse) et surtout progressive, une prise de poids brutale étant souvent un signe pathologique. Sur ces 10 à 12 kg, le fœtus représente environ 3,5 kg, l'utérus 1 kg, le placenta, le liquide amniotique et les membranes 1,2 kg, les seins 1 kg, le reste comprend les graisses, le liquide extracellulaire et le sang. Les affections du dernier trimestre (surtout la dysgravidie) s'accompagnent le plus souvent d'un excès de poids et, à l'inverse, une prise de poids excessive favorise l'apparition d'états pathologiques comme un diabète. « Le troisième trimestre est lourd. »

## 4. Tension artérielle

La prise de la tension artérielle (TA) est obligatoire. Elle doit s'effectuer au repos, en position assise et aux deux bras. La TA s'abaisse légèrement. Elle ne doit jamais dépasser 140-90 mmHg. Une valeur supérieure d'un des deux chiffres signifie une hypertension artérielle. La diminution tensionnelle physiologique peut être responsable de vertiges.

## 5. Modifications des seins

La tension mammaire est le signe sympathique de grossesse le plus connu. Il est dû à l'augmentation du volume de ces glandes sous l'action hormonale. Le sein s'alourdit et un lacis veineux devient visible. L'aréole se pigmente et apparaissent des tubercules de Montgomery. La pression du mamelon peut faire sourdre du colostrum.

## 6. Pigmentation cutanée et vergetures

La peau va se pigmenter, surtout au niveau de la face (masque de grossesse ou chloasma), sur la ligne médiane de l'abdomen et sur les cicatrices. Les vergetures, stries rouge violacé de 1 à 2 cm de long sur l'abdomen, sont très fréquentes, surtout chez les jeunes primipares qui ont une prise de poids excessive, et le plus souvent entre le sixième et le huitième mois. Les cheveux deviennent fragiles et cassants.

## 7. Troubles digestifs

Ils sont nombreux et variés. Les plus fréquents sont les nausées et les vomissements du premier trimestre. Les vomissements incoercibles en sont une forme pathologique parfois dramatique. La femme peut également se plaindre de constipation consécutive à la progestéronémie (qui diminue le péristaltisme intestinal et la motilité gastrique), d'hypersalivation ou de pyrosis.

## 8. Troubles nerveux

Ils sont eux aussi très fréquents. Insomnie, hypersomnie, irritabilité, émotivité, envies, dégoûts sont souvent décrits.

## 9. Mal de dos

L'accroissement des contraintes mécaniques, qui s'exercent en particulier sur la colonne vertébrale et les muscles, est générateur de douleurs dorsales ou de leur augmentation. Les sécrétions hormonales et les malpositions peuvent y contribuer. La cause la plus fréquente est le déséquilibre de la statique vertébrale. À mesure que l'utérus augmente de volume, les muscles abdominaux se distendent et les muscles lombaires et fessiers se contractent, entraînant des modifications des courbures du rachis. Le phénomène peut être amplifié par l'augmentation du poids des seins. Par ailleurs, le nerf sciatique peut être comprimé par le fœtus, ce qui peut entraîner des douleurs dorsales avec irradiation aux membres inférieurs.

## 10. Modifications de la muqueuse vaginale

Elle va prendre un aspect œdématié et violacé qui s'étendra jusqu'à la vulve.

## L'essentiel de la question

La grossesse est l'état physiologique de la femme à la suite de la fécondation et jusqu'à l'expulsion du fœtus après normalement un peu plus de 41 semaines d'aménorrhée. Des signes fonctionnels (digestifs, nerveux, urinaires, etc.) sont associés à son premier trimestre.

Elle comporte plusieurs étapes de durée variable : la fécondation et la migration de l'œuf, la nidation, puis la période embryonnaire avec l'embryogenèse, la morphogenèse et l'organogenèse qui s'étend sur deux mois environ, enfin la période fœtale, de maturation, qui se termine par l'accouchement. Le fœtus possède une forme humaine à trois mois et, légalement, il est viable au-delà du sixième mois, d'où la distinction opérée entre l'accouchement et l'avortement.

Des formations temporaires destinées à protéger et à nourrir l'embryon, puis le fœtus, au cours de sa vie utérine, se développent et évoluent pendant les neuf mois de la gestation. Elles comprennent le placenta et le cordon ombilical, les membranes de l'œuf et le liquide amniotique. Le placenta possède de multiples fonctions : échanges de gaz respiratoires, d'eau, d'électrolytes et de substrats, protection vis-à-vis des xénobiotiques, fonction hormonale, essentielle au maintien de la grossesse, à la croissance fœtale et à l'accouchement. Cette fonction est assurée par des hormones polypeptidiques – dont principalement l'hormone gonadotrope chorionique et l'hormone lactogène placentaire –, et des hormones stéroïdiques, la progestérone et les estrogènes.

La grossesse présente deux phases hormonales : placento-ovarienne, d'intérêt diagnostique au premier trimestre, puis materno-fœto-placentaire, qui permet la surveillance de son évolution.

Au cours de la gestation, l'organisme maternel subit d'importantes modifications physiologiques et biologiques qui affectent l'hémodynamique, le sang, la fonction rénale, la ventilation, le système digestif et les métabolismes. Diverses modifications endocriniennes non spécifiques se produisent également.

Enfin, en dehors de l'aménorrhée, la femme subit dans son corps des changements transitoires, généraux ou locaux, tels qu'une élévation thermique, une prise de poids – qui doit être contrôlée –, des modifications des seins, une pigmentation cutanée (masque de grossesse), des troubles veineux (varices), des changements dans ses goûts alimentaires ou son psychisme, etc.

***Pour en savoir plus***


- Audibert F., Cayol V., *Gynécologie*. Paris, Estem « Med-Line », 1998.
- Frydman R., Taylor S., *La Grossesse*. PUF, « Que sais-je ? », 2e éd., 2002.
- Marieb E. N., *Anatomie et physiologie humaines*. Adaptation française de la 6e éd. américaine par R. Lachaîne, Pearson Éducation, Paris, 2005, chapitre 28, « Grossesse et développement prénatal », 1144-1172.
- Tournaire M., *Physiologie de la grossesse*. Paris, Masson, 1991.
- Treisser A., Physiologie de la grossesse normale. *Rev Prat* 1990 ; 40, n° 1 : 60-64.
- *Science et Vie*, hors-série, Neuf mois pour venir au monde. Trente questions pour la plus belle aventure de la vie, 2006 ; 234.

# Biochimie analytique et clinique



# Électrophorèses

M. BELJEAN-LEYMARIE
Laboratoire de biologie, CHS, Caen.
C. DESBENE, Service de biochimie et génétique moléculaire,
Hôpital Henri Mondor, AP-HP, Créteil.

*L'électrophorèse est, à l'origine, une méthode de séparation d'espèces ionisées fondée sur leur mouvement sous l'influence d'un champ électrique. Les espèces migrent dans un milieu liquide, le plus souvent supporté par un matériau inerte solide (support). Les développements actuels ont permis d'étendre aux molécules non ionisées cette méthode de séparation. Nous distinguerons :*
- *l'électrophorèse classique ;*
- *les développements récents ;*
- *l'électrophorèse capillaire.*

# I. Électrophorèse classique

La théorie de l'électrophorèse est compliquée et encore incomplète, nous nous limiterons donc à une simple description des principes permettant la compréhension des applications analytiques de la méthode.

## A. Généralités

### 1. Principe

Sous l'influence du champ électrique E, les particules de charge nette négative migrent vers l'anode, les particules de charge nette positive migrent vers la cathode, les particules sans charge nette ne migrent pas. La vitesse de migration $\upsilon$ des molécules ($cm \cdot s^{-1}$) est liée :
- au champ électrique ;
- à la molécule elle-même.

#### a) Champ électrique E

La vitesse de migration augmente lorsque E augmente, de sorte que : $\upsilon = \mu \cdot E$. $\mu$ est la mobilité électrophorétique, c'est une constante égale au rapport :

$$\frac{\text{Vitesse de migration}}{\text{Force de E}}$$

$\mu$ s'exprime donc en $\frac{cm \cdot s^{-1}}{V \cdot cm^{-1}} = cm^2.V^{-1}.s^{-1}$.

*Rappel :* E est créé entre deux électrodes distantes de 1 cm, aux bornes desquelles on impose une différence de potentiel V. E = V/1 (volts · $cm^{-1}$). Le milieu compris entre les deux électrodes offre une résistance R(ohms) de façon que V = Ri (i en ampères = courant traversant la cuve d'électrophorèse). Ce milieu (la solution) est ionique et présente une conductivité $\chi$ proportionnelle à la concentration en ions, donc à la force ionique. La résistance R de la solution est d'autant plus faible que la solution ionique est plus concentrée. Pour un voltage donné, le courant est d'autant plus grand et l'échauffement par effet joule (proportionnel à $Ri^2$) d'autant plus important que la concentration ionique est plus élevée.

### b) Molécule

Dans la théorie simplifiée, on considère une molécule sphérique isolée. La molécule isolée de charge Q, soumise à un champ uniforme E subit une force QE et migre vers l'électrode de charge opposée. Elle s'accélère rapidement. Mais à cette accélération va s'opposer une force de friction F' (force de résistance visqueuse). L'amplitude de cette force de friction dépend de la viscosité $\eta$ du milieu, de la taille et de la forme de la molécule en mouvement – une petite molécule compacte offrant moins de résistance au mouvement qu'une molécule large ou de forme irrégulière. Selon la loi de Stockes, $F' = 6\pi\, \eta r \upsilon$ (r = rayon de la molécule considérée comme sphérique). Quand la force électrique est égale à la force de friction, il n'y a plus d'accélération. La molécule a atteint une vitesse constante : QE est alors égale à $6\pi\, \eta r \upsilon$, donc $\upsilon = QE/6\pi\, \eta r$. La particule a pour vitesse $\upsilon = \mu E$, décrite précédemment. En conséquence, *pour que la vitesse de migration reste constante, il faut que restent constantes* :

- la viscosité du milieu ;
- la force du champ électrique ;
- la charge nette Q ;
- la taille et la forme de la molécule.

La mobilité $\mu = Q/6\, \pi\eta r$. On peut donc conclure que, dans *un milieu donné*, il sera possible de séparer des molécules :

- ou bien sur la base de leur différence de charge Q ;
- ou bien, si les charges sont les mêmes, sur la base des différences de taille ; mais, en fait, sur *la variation de Q/r*.

*Remarque :* cette théorie de l'électrophorèse est simplifiée du fait que les molécules sont considérées comme parfaitement sphériques et ne subissant de la part du milieu dans lequel elles se déplacent que la force de friction. En réalité, aucune molécule *n'est parfaitement sphérique* et les forces de friction sont alors plus importantes. De plus, l'électrophorèse se déroule *dans un milieu ionique*. Il existe donc des interactions électrostatiques entre les groupes chargés de la molécule et les ions du milieu. Les molécules s'entourent d'ions de charges opposées. Le nuage fait écran à l'action du champ électrique. Les interactions électrostatiques seront fonction de la constante diélectrique du milieu $\varepsilon$. L'environnement ionique est partiellement rompu par $\varepsilon$ et par le mouvement de la molécule dans le milieu, la vitesse de migration d'une molécule chargée sera inférieure à celle prédite par la théorie simplifiée. Pour une macromolécule, il existe un certain nombre de charges disposées à sa surface, responsables d'un potentiel dit « électrocinétique zêta » ($\zeta$). Étant donné cet environnement, on peut montrer que le potentiel zêta, ou potentiel électrocinétique, varie avec la force ionique du milieu.

## 2. Espèces séparées en électrophorèse classique

L'électrophorèse s'applique à la séparation des molécules ionisables, le plus souvent d'origine biologique :

- composés de bas masse moléculaire, acides aminés (AA), petits peptides, nucléotides ;
- composés de haute masse moléculaire, macromolécules d'intérêt biologique, protéines et acides nucléiques (ARN et ADN). La charge nette des protéines peut

être positive ou négative. La charge nette des acides nucléiques est toujours négative.

### a) Séparation des protéines

En électrophorèse, les propriétés les plus importantes des protéines sont la charge Q et la taille r. La charge nette d'une protéine en solution aqueuse dépend des caractéristiques d'ionisation des chaînes latérales constituées d'acides aminés. Par exemple :

- à pH bas, les groupements acides carboxyliques ne sont pas ionisés tandis que les groupements aminés sont protonés. Les protéines sont donc chargées positivement ;
- à pH élevé, les –COOH sont ionisés en $COO^-$ tandis que les $NH_2$ ne le sont pas. La charge nette de la protéine est négative ;
- à pH intermédiaire, certaines chaînes sont protonées et d'autres pas, selon les valeurs des $pK_a$.

Chaque protéine se caractérise, dans un solvant donné, par son pH isoélectrique pI, pH pour lequel sa charge nette Q est nulle. Lorsque le pH est inférieur à pI, la charge nette est positive. Lorsque le pH est supérieur à pi, la charge nette est négative.

*Remarque :* la séparation électrophorétique des protéines en milieu dénaturant permet souvent une étude plus fine. On peut ajouter au tampon :

- de l'urée 5 à 9 M ou du chlorhydrate de guanidine 6 M pour rompre les liaisons hydrogènes intra- et intercaténaires ;
- des groupements thiols (mercaptoéthanol, dithiothréitol, etc.) pour rompre les liaisons disulfures intra- et intercaténaires ;
- du dodécylsulfate de sodium (SDS) qui permet la dissociation des agrégats protéiques. L'anion dodécylsulfate se fixe sur les protéines à raison de 1,4 g de SDS pour 1 g de protéines, ce qui confère aux protéines un caractère anionique et un même Q/r. Seul un support permettant une différenciation de taille (tamisage), le plus souvent le gel de polyacrylamide (PAG %), rendra possible leur séparation.

### b) Séparation des polynucléotides

Tous les polynucléotides sont des esters phosphoriques ionisés sous forme $n(RHPO_4^-)$, insolubles à pH acide, solubles en milieu neutre ou basique pour les ARN et solubles uniquement en milieu basique pour les ADN.

*Ils sont ionisés négativement lorsqu'ils sont dissous en solution aqueuse.* En conséquence, il est à noter que : pour les polynucléotides, *le rapport charge/taille* est virtuellement *constant* puisque lorsque le nombre de nucléotides augmente, le nombre de $PO_4^-$ augmente et la chaîne s'allonge dans les mêmes proportions. C'est pourquoi, comme les protéines en milieu SDS, ils ne peuvent être séparés les uns des autres par électrophorèse que si l'on adjoint un procédé de séparation fondé sur la différence de taille, c'est-à-dire sur un support d'électrophorèse permettant la perméation de gel.

## 3. Facteurs et phénomènes influençant la mobilité électrophorétique

### a) Facteurs

#### ■ *Caractéristiques des molécules chargées*

Comme nous l'avons déjà montré, la mobilité électrophorétique dépend de la charge nette et de la taille, ce qui inclut la forme de la molécule et la masse moléculaire.

#### ■ *Caractéristiques du système électrophorétique*

Il existe un certain nombre de paramètres du système électrophorétique lui-même qui peut influencer les séparations. Les plus importants sont :
- le pH du tampon ;
- la composition ionique du tampon ;
- le voltage appliqué ;
- la température ;
- le type du support, voire la taille des pores.

**Le pH du tampon**

*Pour les nucléotides et les polynucléotides*, le changement de pH affecte la rapidité de l'analyse mais pas la séparation. En effet, les molécules ne portent que des charges négatives dont le nombre augmente avec le pH mais tous les nucléotides sont affectés de façon analogue. Le changement de pH n'influe donc pas sur la séparation.
Pour *les protéines*, les changements de pH peuvent affecter différemment les différentes protéines en fonction de leur pI.
Les protéines de même taille et de même forme sont séparables à l'aide d'un tampon judicieusement choisi. Toutefois, deux ou plusieurs protéines peuvent migrer ensemble et donner une seule bande. En travaillant à des pH différents, on pourra montrer que la bande unique correspond en réalité à plusieurs protéines.
*Remarque : le pH d'une solution dépend de la température.* Il sera important de minimiser les variations de température pendant le déroulement de l'électrophorèse.

**Composition ionique du tampon d'électrophorèse**

Les macromolécules ionisées s'entourent d'une atmosphère ionique de charge opposée. La charge nette et la mobilité électrophorétique se trouvent diminuées. Il est en général souhaitable de garder la force ionique du tampon d'électrophorèse aussi bas que possible pour minimiser les effets de contre-ion. Toutefois, beaucoup de polypeptides et de polynucléotides ne peuvent être solubilisés que dans des solutions de grande force ionique tandis que quelques protéines sont solubles à faible concentration ionique mais précipitent à forte concentration ionique (*salting out*). Ce phénomène, non seulement fonction de la nature des protéines mais aussi de la nature des ions, est à redouter, particulièrement lorsque se produit une évaporation au cours de l'électrophorèse.

**Voltage appliqué**

Plus V est grand, plus la molécule migre rapidement, plus le phénomène de diffusion est réduit. Cependant, le courant i augmente avec V et l'énergie dissipée sous forme de chaleur (effet joule) entraîne une hausse de la température du milieu. Une

relativement faible progression peut entraîner une importante montée de chaleur qui peut s'intensifier et entraîner des effets néfastes non négligeables sur la séparation, d'où la nécessité de réaliser un compromis : V doit être suffisant pour que l'on ait une migration rapide, mais pas trop pour ne pas générer trop de chaleur.

**Effet de la température**

La température doit être constante. Si l'effet joule n'est pas compensé par un système de refroidissement efficace, un certain nombre de phénomènes peut éventuellement se produire simultanément :
- des courants de convection ;
- une diffusion (importante si l'électrophorèse dure plusieurs heures) ;
- une évaporation : l'électrophorèse est toujours réalisée dans un système clos pour minimiser les pertes par évaporation qui augmentent avec la température et peuvent entraîner le séchage des supports et l'augmentation de la force ionique ;
- un changement de viscosité.

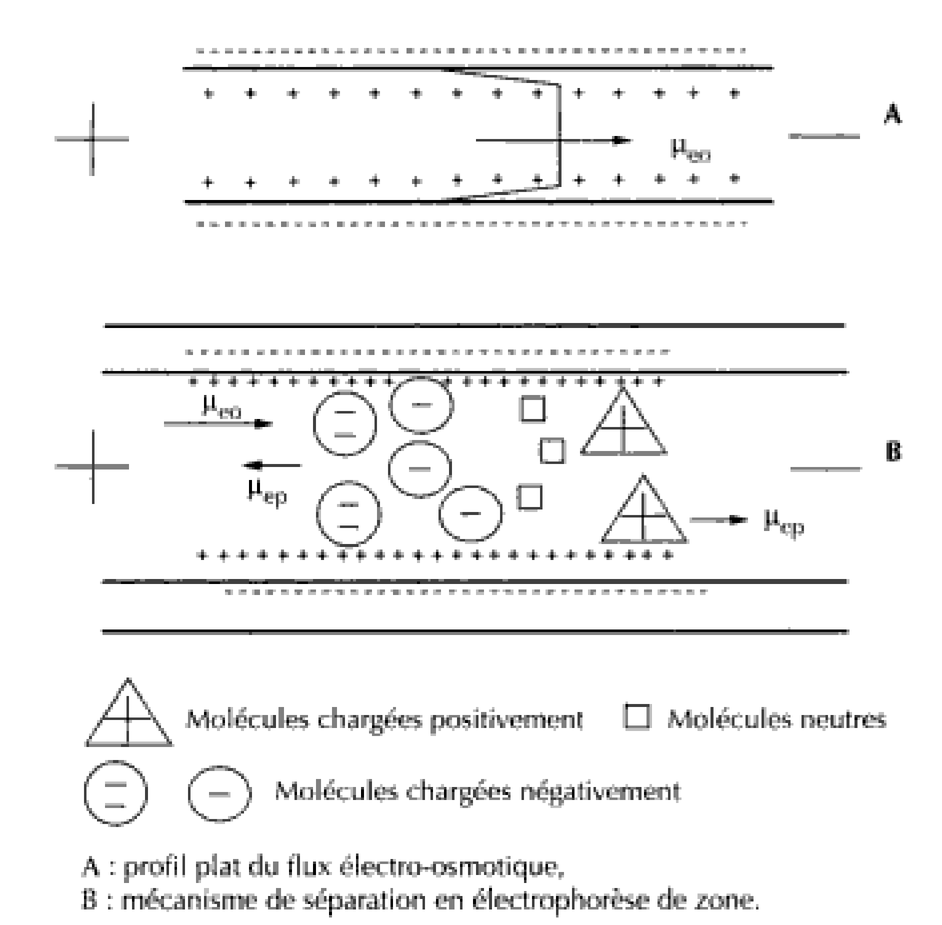
Ces différents phénomènes sont responsables de l'apparition de zones de distorsion : par exemple, pour les gels de polyacrylamide, la température est un facteur très critique. Si le refroidissement est inadéquat, la température du milieu n'est plus homogène : les molécules du même soluté ont alors une vitesse de migration inégale, les bandes de migration se déforment, des zones voisines peuvent se chevaucher et la résolution devient très mauvaise.

**Le choix du support**

En électrophorèse de zone, le choix du support repose sur un certain nombre de considérations : la taille des molécules, la quantité disponible de l'échantillon pour l'analyse, le problème analytique posé (homogénéité de l'échantillon ? masses moléculaires des différents composés ?), le temps d'analyse souhaité, le coût du support et de l'équipement, la disponibilité de l'équipement, l'expérience de l'opérateur…

### b) Le phénomène d'électroendosmose

À côté des phénomènes de convexion, diffusion et évaporation décrits, on observe un phénomène d'électroendosmose qui modifie la mobilité des espèces : l'électroendosmose, ou électro-osmose, correspond au transport des molécules de solvant résultant de l'existence d'une double couche électrique à une interface solide-liquide chargée. En effet, à cette interface, le support (solide) peut être ionisé (l'ionisation dépendant de la nature du support, de la force ionique et du pH du tampon). Il présente, le plus souvent, des charges négatives schématiquement. La gaine liquide contiguë est en conséquence globalement chargée positivement (*fig. 1*) et le liquide contenu dans les microcanaux du support migre vers la cathode avec une certaine vitesse (vitesse électro-osmotique $\upsilon_{osm}$) proportionnelle à E, entraînant vers la cathode toutes les espèces *ionisées ou non*. Les molécules neutres migrent donc avec une vitesse $\upsilon_{osm} = \mu_{osm} E$ ($\mu_{osm}$ est la mobilité électro-osmotique). Cette vitesse $\upsilon_{osm}$ s'ajoute à la vitesse électrophorétique pour les molécules ionisées positivement, se retranche pour les molécules présentant des charges négatives. Ce phénomène gênant en électrophorèse classique est, au contraire, utilisable de façon bénéfique en électrophorèse capillaire.




A : profil plat du flux électro-osmotique,
B : mécanisme de séparation en électrophorèse de zone.

**Figure 1.** Phénomène d'électroendosmose

## B. Différents systèmes électrophorétiques

Il existe trois types de système électrophorétique :

- électrophorèse en veine liquide ;
- électrophorèse de zone ;
- électrophorèse en *steady state* (état stationnaire) :
  - isofocalisation ;
  - isotachophorèse.

### 1. Électrophorèse en veine liquide (*moving boundary electrophoresis* ou électrophorèse frontale)

Dans ce procédé décrit initialement par A. Tiselius, une grande bande d'échantillon est placée dans un tube en U. On superpose dans chaque branche une solution tampon assurant le contact avec les électrodes. Lorsque l'on applique un champ électrique, les différents constituants de l'échantillon migrent dans une direction et avec une vitesse déterminées par leur propre mobilité électrophorétique. *La séparation complète* des divers constituants de l'échantillon *n'est jamais réalisée*, seuls les composants les plus rapides (dans chacune des directions) sont partiellement purifiés, tandis que les composants restants se recouvrent à différents degrés. Cette technique est, du fait de la non-séparation totale, peu utilisée en électrophorèse classique et réservée aux mesures de mobilité électrophorétique. En revanche, elle comporte des applications en électrophorèse capillaire (détermination de constantes physico-chimiques telles que les constantes de complexations).

## 2. Électrophorèse de zone

Dans ce cas, la migration des molécules s'effectue dans une trame solide imprégnée d'une solution tampon. Les composants sont complètement séparés les uns des autres, formant des zones discrètes. Il existe différentes façons de stabiliser les zones séparées dont les plus fréquentes sont l'utilisation d'un support et celle d'un gradient de densité.

### a) Utilisation d'un support

C'est, de loin, la méthode la plus employée pour la séparation de constituants d'un mélange. On utilise un support poreux. Ce support stabilise le milieu liquide tamponné. L'échantillon est déposé sur le support en une zone étroite. Le passage du courant entraîne la séparation des différents constituants qui migrent en fonction de leur mobilité propre. Les supports se classent en deux groupes :

- ceux qui donnent des séparations comparables à celles obtenues en veine liquide = papier, gel d'agar, acétate de cellulose. Ces supports donnent, par exemple, cinq fractions à partir d'un sérum :
  - albumine ;
  - $\alpha_1$-globulines ;
  - $\alpha_2$-globulines ;
  - $\beta$-globulines ;
  - $\gamma$-globulines.

■ *L'acétate de cellulose*

Ce polyholoside, dans lequel les OH sont acétylés, était utilisé couramment sous forme de bandes de quelques centimètres pour la détermination des cinq bandes principales des protéines sériques (*fig.* 2).

- ceux qui font intervenir des phénomènes de filtration moléculaire : les gels d'amidon, de polyacrylamide et d'agarose font apparaître, à partir d'un sérum, un nombre plus important de fractions :

■ *Le gel d'amidon*

Aujourd'hui peu utilisé mais il est encore assez souvent considéré comme le support de choix pour la séparation des iso-enzymes.

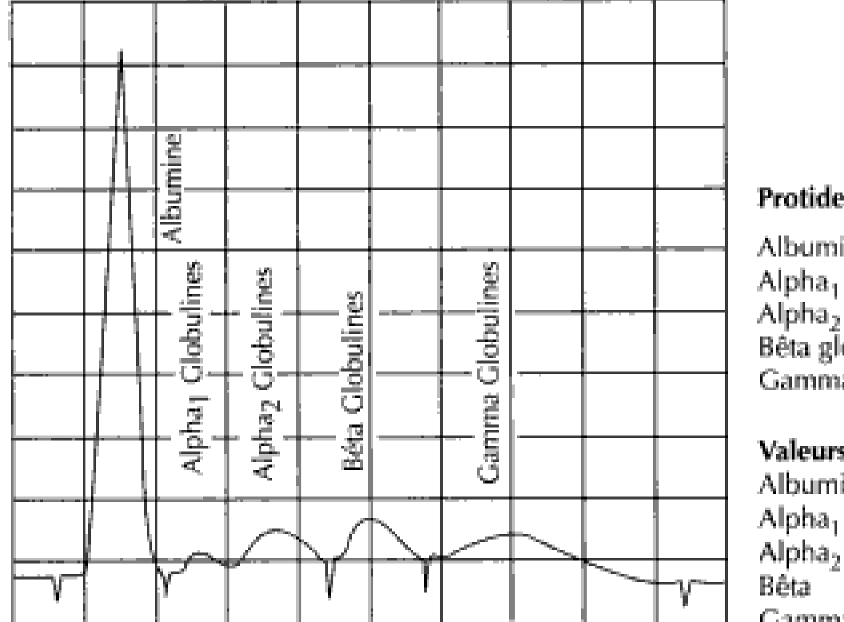
■ *Les gels de polyacrylamide (PAG)*

Ils sont les milieux les plus utilisés par les biochimistes. Le PAG est obtenu par polymérisation croisée entre l'acrylamide et un composé bifonctionnel, le N,N'-méthylène bisacrylamide. Il est utilisé après gonflement dans un tampon et constitue un *gel*. Les espaces entre les molécules du gel constituent les pores. Selon le type de séparation désirée, on choisit un degré différent de porosité. Pour un gel de polyacrylamide, la porosité est caractérisée par deux valeurs T et C :

- T est le pourcentage d'acrylamide et d'agent de réticulation (bisacrylamide) dans l'ensemble du gel :

$$T = \frac{\text{acrylamide + bisacrylamide}}{\text{masse totale du gel}} \times 100$$

- C est le pourcentage de bisacrylamide dans l'ensemble acrylamide plus bisacrylamide.




**Protides totaux 60 à 80 g/l**

| | |
|---|---|
| Albumine | 32 à 50 g/l |
| $Alpha_1$ globulines | 1 à 4 g/l |
| $Alpha_2$ globulines | 6 à 10 g/l |
| Bêta globulines | 6 à 13 g/l |
| Gamma globulines | 7 à 15 g/l |

**Valeurs usuelles en %**

| | |
|---|---|
| Albumine | 58 ± 5 |
| $Alpha_1$ | 3 ± 1,5 |
| $Alpha_2$ | 9 ± 3 |
| Bêta | 14 ± 3 |
| Gamma | 16 ± 4 |

**Figure 2.** Électrophorèse des protéines sériques humaines
Profil normal sur acétate de cellulose

Les gels poreux habituellement utilisés ont 3 à 5 % de T et 2 à 3 % de C.
Dans de tels gels, le mouvement des molécules y est fonction de la taille des pores du gel et de la forme du rayon de la molécule : une petite molécule migrera vite, une molécule plus grande que la taille des pores sera retenue en arrière, une très grosse molécule ne pourra pas pénétrer dans le gel. Le gel joue le rôle de *tamis moléculaire*. Lorsque l'on veut une séparation en fonction de la taille, on utilise des PAG de porosité restreinte (uniforme ou en gradient de T variable). La taille des pores diminue lorsque la concentration en acrylamide augmente. On peut montrer que pour des molécules de même type (protéines en milieu SDS et acides nucléiques) il existe, dans ces gels, une relation entre la vitesse de migration des molécules à travers le tamis et leur masse moléculaire.

■ ***Gels d'agarose***

Présentant des pores plus gros que les gels de polyacrylamide, ils sont adaptés à la séparation des grosses protéines ou des acides nucléiques. Les gels d'agarose sont aujourd'hui couramment utilisés pour l'électrophorèse des protéines sériques, des lipoprotéines, des hémoglobines ou pour la séparation des iso-enzymes. Les électrophorèses menées dans ces gels étaient parfois appelées « électrophorèse à haute résolution » mais, avec l'avènement de l'électrophorèse capillaire (voir ci-après), cette dénomination est à éviter.

### b) Électrophorèse de zone par stabilisation d'un gradient de densité

L'électrophorèse est menée dans une colonne de gradient de densité qui empêche les courants de convection pouvant perturber la séparation des zones. Les gradients sont habituellement faits de solutions de saccharose, de glycérol, ou d'éthylène glycol, substances très solubles dans l'eau, non ionisées et donc incapables d'interagir avec les substances à séparer.

## 3. Électrophorèses à l'équilibre (« steady state »)

Ces méthodes se caractérisent par le fait que, après un certain temps d'électrophorèse, un état d'équilibre est atteint dans lequel la largeur voire la position des zones de composants séparés ne changent plus avec le temps.

### a) Isofocalisation (IEF)

Pendant l'isofocalisation, un gradient stable de pH est créé entre anode et cathode, les pH les plus élevés étant à la cathode et les pH les moins élevés étant à l'anode. Sous l'influence du champ E appliqué, les molécules chargées de l'échantillon migrent dans le gradient de pH jusqu'à ce qu'elles atteignent la zone de pH égale à leur pH isoélectrique pI où elles s'immobilisent, leur charge nette devenant nulle. Pour les polypeptides et les protéines, cela correspond à leur point isoélectrique.
Il s'agit d'une technique *à très haut pouvoir de résolution*, qui peut être utilisée en préparative et dont la principale limitation est la précipitation de certaines protéines à leur point isoélectrique. Le haut pouvoir de résolution est lié au fait que la technique va dans son principe même s'opposer au phénomène de diffusion. En effet, lorsqu'une molécule, de protéine par exemple, est arrivée au pH = pI, elle ne subit plus d'action de E. Si elle diffuse, elle migre vers des zones de pH différents. Si elle diffuse vers pH > pI, elle se charge négativement, migre alors vers l'anode et retourne au pH = pI. À l'inverse, si elle diffuse dans la zone de pH < pI, elle se charge positivement et migre alors vers la cathode et retrouve le point de pH = pI.
Le gradient de pH utilisé doit être stationnaire. Il est obtenu grâce au mélange de différentes substances amphotères, les « ampholytes » de PM 300 à 700 daltons qui ont des charges nettes qui varient avec le pH, les différents ampholytes ayant différents pI. À la mise sous tension, les différents ampholytes se rangent dans l'ordre de leurs pI. Ceux dont le point isoélectrique est le plus bas se rangent vers l'anode, ceux dont le point isoélectrique est le plus haut, vers la cathode. Le gradient est stabilisé à l'aide de gels ou de phases solides hydrophiles. Des immobilines, ampholytes fixés de façon covalente à l'acrylamide, ont récemment été commercialisés. Dans ce cas, le gradient n'est pas généré par le passage du courant, mais constitué au départ par un mélange de solutions adéquates d'acrylamide placées dans un formeur de gradient classique (gamme de quatre unités pH dans la zone de pH 3-11).
En isofocalisation, on peut, par exemple, séparer les protéines sériques en quarante fractions. Le pouvoir de résolution est supérieur à 0,01 unité pH. Ainsi, l'IEF est capable de séparer deux protéines, ou isoformes, dont la seule différence peut alors être une substitution d'un AA neutre ou acide par un acide aminé basique.

### b) Isotachophorèse

Dans ce type d'électrophorèse, en fin de séparation, toutes les bandes d'échantillon migrent à la même vitesse. L'échantillon est inséré entre deux solutions différentes d'électrolytes :

- un électrolyte porteur pilote (*leading*) ;
- un électrolyte terminal.

Tous les composés chargés s'alignent l'un derrière l'autre en fonction de leur mobilité électrophorétique. Pour séparer deux ions l'un de l'autre, il doit y avoir une différence d'au moins 10 % entre leurs mobilités électrophorétiques. Dans ce type

d'électrophorèse, on sépare des cations ou bien des anions mais pas les deux à la fois. Si l'on veut analyser des cations, l'électrolyte porteur sera placé du côté de la cathode. Il sera constitué d'un cation de très grande mobilité (comme $H_3O^+$), de mobilité plus importante que les cations à analyser. L'électrolyte terminal est, quant à lui, déposé à l'anode et constitué d'un cation de plus faible mobilité que tous les cations à analyser. Quand on applique un E, un gradient de potentiel s'établit, qui permet à tous les ions de voyager à la même vitesse (*cf.* III.D.3.b). Dans les régions où sont présents les cations de faible mobilité, E est plus fort. Par la suite, en fin de séparation, les cations les moins mobiles migrent à la même vitesse que les cations les plus mobiles.

### C. Principe de l'appareillage

Les principaux éléments sont :
- le générateur de courant continu stabilisé ;
- les cuves contenant l'ensemble du dispositif de migration. Elles doivent être fermées afin que leur atmosphère puisse être saturée en vapeur d'eau de façon à minimiser les phénomènes d'évaporation par effet joule. Les dispositifs maintenus dans les cuves sont des films, des plaques, des tubes ou des disques imprégnés de tampons et dont chacune des deux extrémités est reliée soit à l'anode soit à la cathode.

La détection s'effectue *in situ*. Après l'électrophorèse, les différents constituants sont mis en évidence sur le support à l'aide de colorants plus ou moins spécifiques (rouge Ponceau ou amidoschwarz pour les protéines, noir Soudan pour les lipoprotéines, bleu Alcian pour les glycoprotéines, acridine orange ou bromure d'éthidium pour les polynucléotides). La coloration est mesurée et enregistrée en absorbance ou en réflectométrie.

### D. Exemples d'application

Les applications de l'électrophorèse classique sont nombreuses. Nous citerons seulement les plus utilisées en biologie clinique :
- sur acétate de cellulose ou en gel d'agarose : protéines, lipoprotéines, glycoprotéines et iso-enzymes du sérum (voire des urines et du LCR après concentration), hémoglobines sanguines… ;
- en gel de polyacrylamide : lipoprotéinogramme, étude des liquides à faible concentration protéique ;
- recherche de phénotypes : haptoglobine, $\alpha_1$-antitrypsine, détermination de génotypes, séquençage de l'ADN…

## II. Développements ultérieurs

Plusieurs autres modalités de réalisation de l'électrophorèse ont été développées.

### A. Électrophorèse en gel, en champ pulsé

Le champ E est dirigé alternativement pendant un temps court dans une direction, puis dans une autre, voire tout à l'opposé. Cette méthode est utilisée pour la sépa-

ration de molécules de haute masse moléculaire. Ce changement de direction permet à ces grosses molécules de trouver un chemin plus facilement dans les mailles du gel (reptation), les molécules pouvant se détendre ou, au contraire, s'enrouler autour des fibres du support. La séparation d'ADN, par exemple, est possible en gel d'agarose jusqu'à environ 50 kilobases lorsque E est constant. Au-delà, les différents ADN migrent à la même vitesse. En champ pulsé, en revanche, les séparations peuvent être obtenues pour des masses moléculaires d'ADN allant de 5 à 10 000 kilobases.

## B. Immuno-électrophorèses

L'immuno-électrophorèse allie la séparation par électrophorèse à la détection très sélective et sensible par réaction immunologique. Cette technique est utilisée :
- pour la détection de petites quantités de protéines ;
- pour l'étude de la pureté d'une préparation d'une protéine en permettant la confirmation de la présence d'un seul antigène.

La réaction de précipitation en milieu liquide gélifié est telle que, pour chaque système antigène-anticorps (Ag-Ac), il y aura un rapport optimum (Ag)-(Ac) à utiliser pour obtenir la précipitation du complexe Ag-Ac. En effet, s'il existe dans le milieu un grand excès de l'un ou de l'autre (Ag ou Ac), on n'observe pas de précipité et il y a redissolution. La précipitation est optimale dans une région dite « d'équivalence caractéristique » d'un système Ag-Ac donné. Il faudra un temps suffisant pour que tous les sites de liaison de l'Ac se lient à l'Ag (produisant une extension du réseau Ag-Ac qui est alors visualisé sous forme de précipité). Ce complexe est révélé le plus souvent, de façon plus nette, à l'aide d'un colorant classique des protéines. Il existe deux types d'immuno-électrophorèses :
- l'*immuno-électrophorèse classique*, utilisée pour la séparation et l'identification d'un mélange d'antigènes. Il s'agit d'une méthode qualitative qui peut être réalisée de deux façons différentes :
  - selon la méthode classique de Grabar et Williams,
  - selon la méthode par immunofixation ;
- l'*électro-immunodiffusion*, ou immuno-électrophorèse en fusée (*rocket electrophoresis*) = méthode de Laurell. Il s'agit d'une méthode quantitative utilisée pour la détermination d'un antigène *particulier* présent dans un mélange.

  Au plan expérimental :
  - dans le premier cas (immuno-électrophorèse classique), on réalise d'abord une électrophorèse dans un gel et l'on met ultérieurement en évidence les protéines ainsi séparées grâce à des anticorps spécifiques de chaque protéine,
  - dans le deuxième cas (Laurell), l'électrophorèse est menée sur un film d'agarose qui contient l'anticorps spécifique de *la* protéine à analyser. Cette méthode est parfois appelée « électro-immunodiffusion en gel d'agarose ».

### 1. Immuno-électrophorèse classique

#### a) Méthode de Grabar et Williams

Le support utilisé est un gel d'agar ou d'agarose qui comporte deux types de puits :
- un puits ponctuel pour le dépôt de l'antigène (sérum à analyser) ;

- un puits en forme de rigole pour le dépôt de l'anticorps Ac (*fig.* 3) :
  - dans un premier temps, l'électrophorèse est menée sur support après dépôt du sérum ;
  - dans un deuxième temps, l'Ac est déposé dans la rigole. Cet Ac pourra être spécifique d'une protéine recherchée ou être un mélange d'anticorps. Ag et Ac diffusent dans le gel.

Lorsque l'Ag rencontre son Ac spécifique, le complexe Ag-Ac précipite. Le maximum de précipitation se produit lorsque le rapport Ag-Ac correspond à la zone d'équivalence.

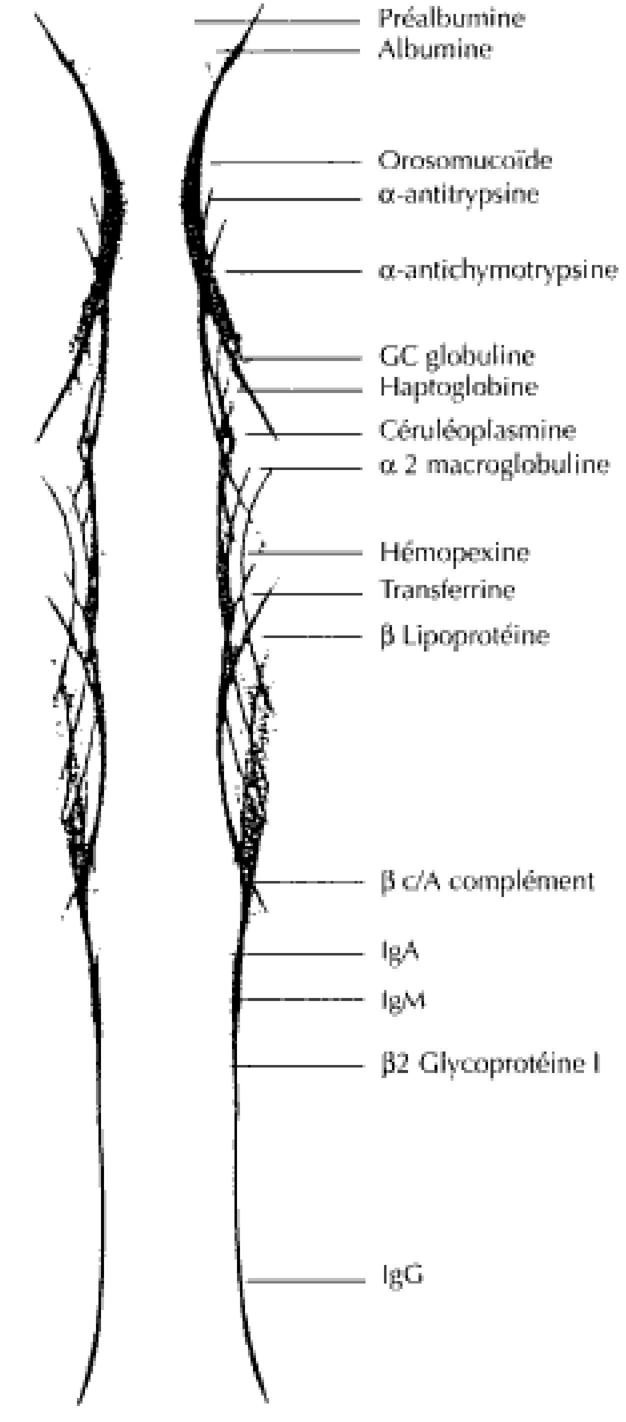



**Figure 3.** Immuno-électrophorèse d'un sérum humain

*Remarque* : les Ag sont habituellement plus petits que les Ac. Les Ag diffusent plus vite. L'Ag cesse de diffuser lorsqu'il précipite, c'est-à-dire lorsque le rapport Ag-Ac a atteint sa zone d'équivalence. Cette zone se situera près de la rigole de dépôt des anticorps et d'autant plus près que l'anticorps sera d'autant plus lourd. Il aura la forme d'un arc de cercle (*fig.* 3), la partie incurvée de l'arc de cercle correspondant à la concentration la plus importante en Ag. Lorsque la précipitation des Ag-Ac est complètement finie, la plaque est lavée avec une solution saline. Les arcs de précipitation peuvent être révélés par le colorant approprié (amidoschwarz = bleu de Coomassie). L'identification s'effectue par comparaison à un sérum de contrôle normal traité dans les mêmes conditions.

### b) Immunofixation

On opère aussi en deux temps :
- électrophorèse sur film ;
- action d'anticorps spécifiques.

*Exemple* :
Étude des Ig :
- six bandes sont découpées sur un gel d'agarose ;
- on dépose l'échantillon à analyser sur chacune des six bandes ;
- on effectue l'électrophorèse ;
- on dépose ensuite quelques µL de l'antisérum choisi (un différent sur chacune des six bandes) :
  - antisérum total,
  - anti-IgG,
  - anti-IgA,
  - anti-IgM,
  - anti-k,
  - anti-λ.

Cela justifie les six électrophorèses identiques. Si l'Ag complémentaire est présent, le complexe Ag-Ac se forme. Après fixation, la plaque est lavée et colorée, laissant uniquement visible le complexe Ag-Ac (*fig.* 4).

## 2. Méthode de Laurell

Il s'agit d'une méthode d'analyse quantitative. Le film d'agarose contenant l'anticorps spécifique est commercialisé prêt à l'emploi. Il comporte des puits où l'on dépose l'échantillon à analyser à raison de quelques µL exactement mesurés. On applique une différence de potentiel et l'Ag migre vers la cathode tant qu'il reste présent. Or la concentration en Ag diminue lors de la migration puisqu'il se forme un précipité du complexe Ag-Ac au fur et à mesure de cette migration. Au départ, il y a un excès de concentration de l'Ag par rapport à l'Ac, et peu de précipité se forme. L'Ag migre à travers le gel jusqu'à ce que la concentration en Ag, au front de migration, devienne égale à la concentration en Ac dans le gel. Il se forme alors le précipité Ag-Ac. L'Ag ne peut pas migrer plus loin. Au total, les lignes de précipitation forment un pic étroit d'Ag-Ac, d'où le nom de fusée (*fig.* 5). En conséquence, plus l'échantillon sera concentré en Ag, plus haut sera le pic. Les plaques du commerce contenant une dizaine de puits, les dosages sont menés simultané-

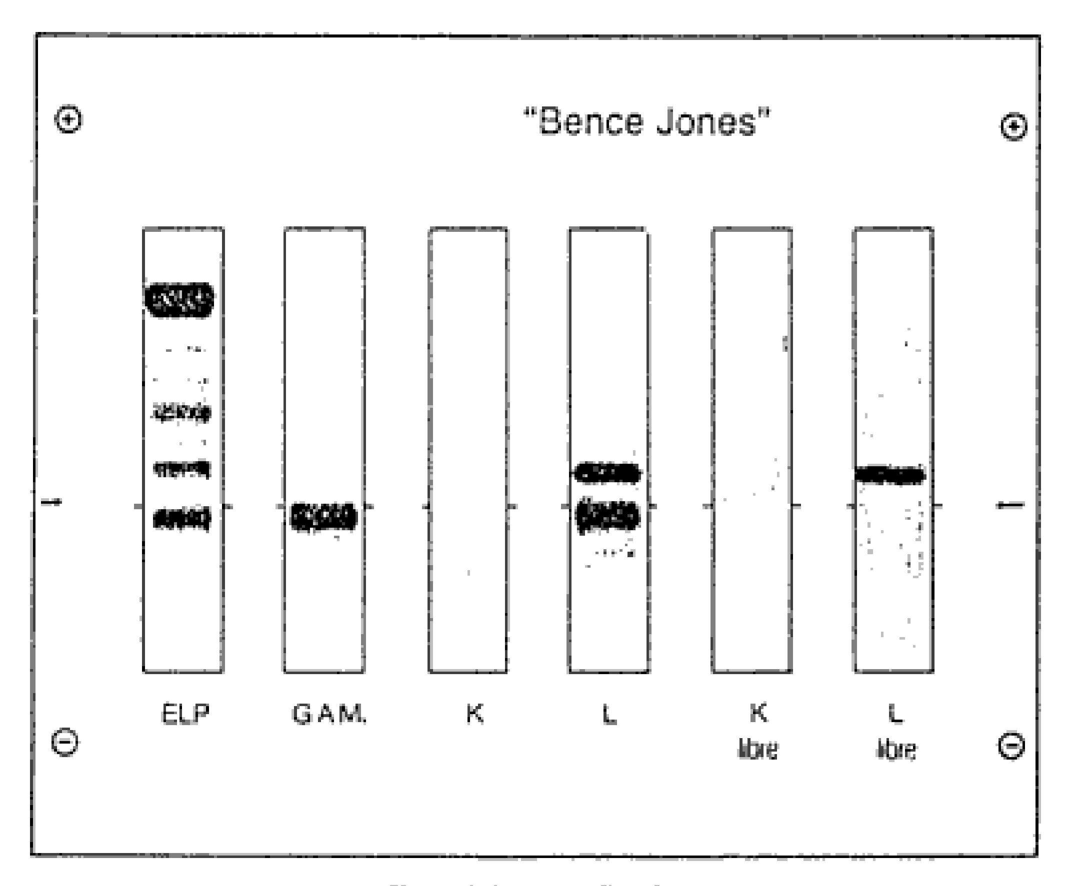



**Figure 4.** Immunofixation

ment à une gamme d'étalonnage réalisée avec des sérums titrés en Ag. Les pics sont révélés, après lavage des plaques avec une solution saline, à l'aide d'un colorant approprié, l'amidoschwarz…

*Remarque* : le gel d'agarose peut comporter deux anticorps, ce qui permet le dosage simultané de deux antigènes comme pour les apolipoprotéines A1 et B (le pic d'apo A1 étant plus important que le pic d'apo B, le dosage simultané est possible).

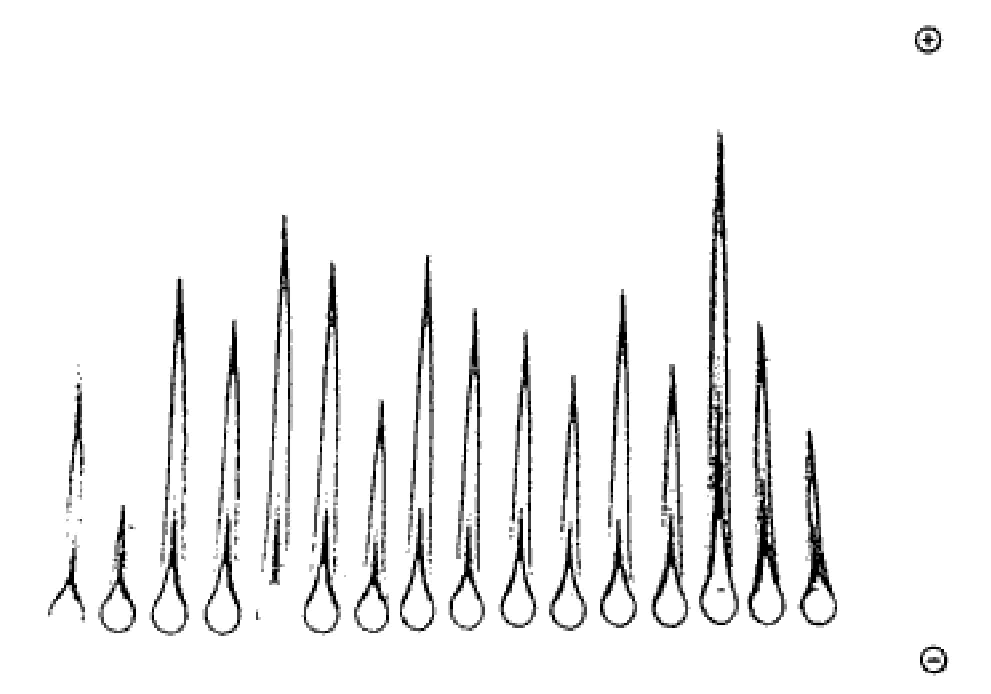


**Figure 5.** Électro-immunodiffusion

## C. Électrophorèse bidimensionnelle

Elle combine deux types d'électrophorèses différentes, le plus souvent une isofocalisation électrique (IEF) suivie d'une électrophorèse en milieu SDS. L'IEF sépare les molécules biologiques en fonction de leur point isoélectrique, le SDS polyacrylamide les résolvant en fonction de leur taille. L'isofocalisation est effectuée en premier, car elle concentre les protéines en bandes extrêmement fines qui deviennent de ce fait de bons échantillons pour la deuxième dimension.

*Modalités* : l'IEF des protéines s'effectue en gel de polyacrylamide. Lorsque celle-ci est terminée, les protéines, ainsi séparées, sont dénaturées *in situ* par incubation du gel dans un tampon contenant du SDS (dodécylsulfate de Na). Les protéines dénaturées sont transférées sur une plaque de SDS-polyacrylamide et l'on entreprend une électrophorèse dans une direction perpendiculaire à la précédente. Les protéines sont ensuite révélées.

On peut séparer par cette méthode jusqu'à cinq mille constituants (*fig. 6*). Il s'agit d'une méthode qualitative non utilisable en analyse quantitative car elle cause d'assez importantes pertes de protéines, surtout celles de basse masse moléculaire. Cette méthode est essentiellement limitée au domaine de la recherche.

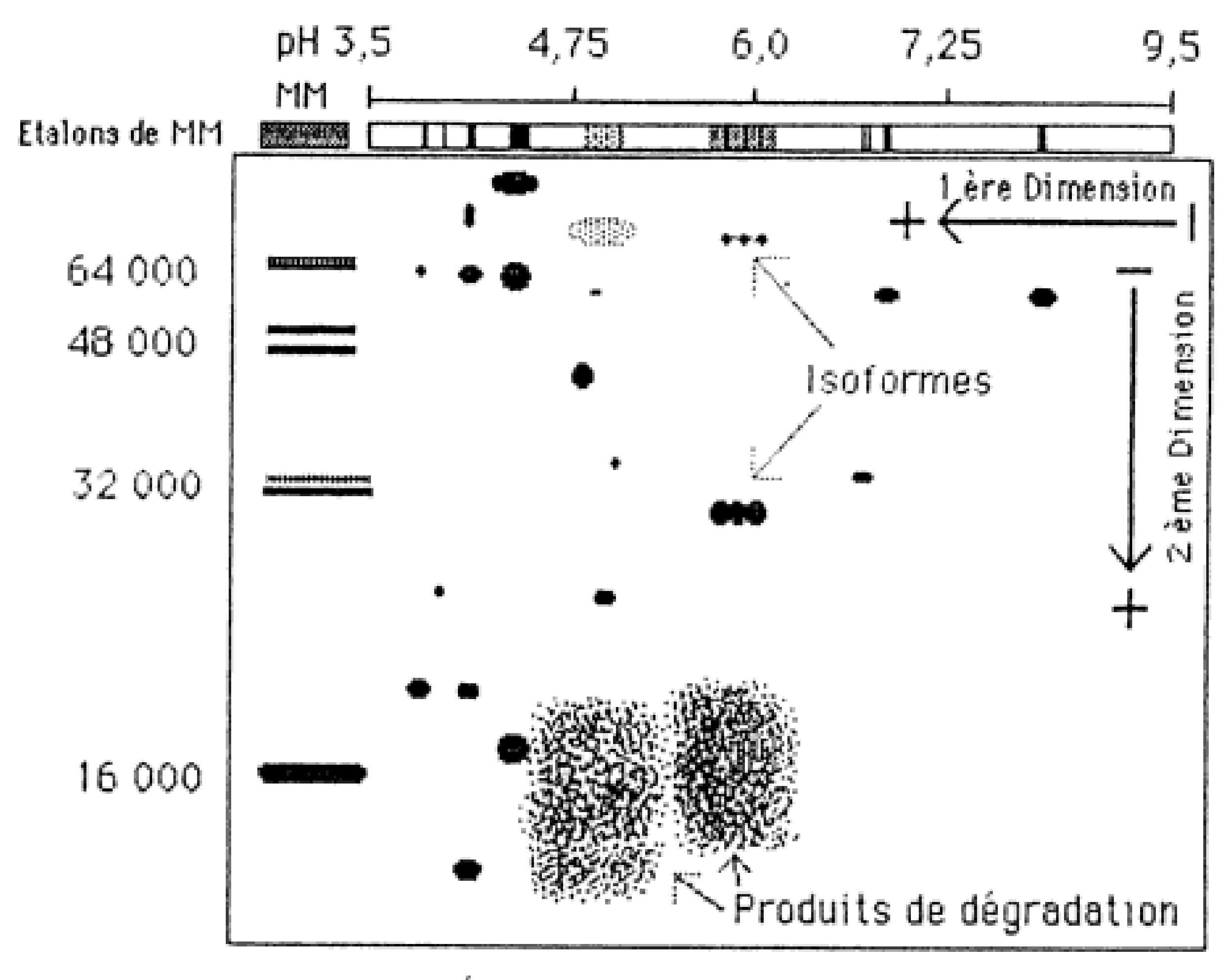



**Figure 6.** Électrophorèse bidimensionnelle

# III. Électrophorèse capillaire

## A. Principe

L'électrophorèse est menée dans un capillaire de silice fondue de 25 à 100 µm de diamètre intérieur et de 15 à 100 cm de long, rempli de solution tampon d'électrolytes. Le champ E utilisé est très élevé, pouvant aller jusqu'à 1 000 $V.cm^{-1}$. L'échantillon est introduit à une extrémité du capillaire, en général anodique. Les deux extrémités plongent dans deux réservoirs, contenant le même électrolyte, où plongent aussi les électrodes de platine (*fig. 7*). Influencés par un champ E, les solutés se séparent progressivement au sein de l'électrolyte par différence des vitesses de migration (V) – à la condition que leurs mobilités électrophorétiques propres ($\mu_{ep}$) soient toutes différentes – et sont détectés, lors de leur passage dans le détecteur, sous forme d'un pic très fin.

$$V = \mu_{app.} E = \mu_{app.} \frac{V}{L}$$

Avec :
- $\mu_{app}$, la mobilité apparente = $\mu_{ep} + \mu_{eo}$, $\mu_{eo}$ étant la mobilité de l'électro-osmose (voir plus loin),
- V = la tension appliquée,
- L = la longueur totale du capillaire.

La détection peut s'effectuer à travers le capillaire ou à l'aide d'une interface, comme dans le cas du couplage à la spectrométrie de masse. Le signal enregistré en fonction du temps conduit à un électrophorégramme. Lorsque les conditions

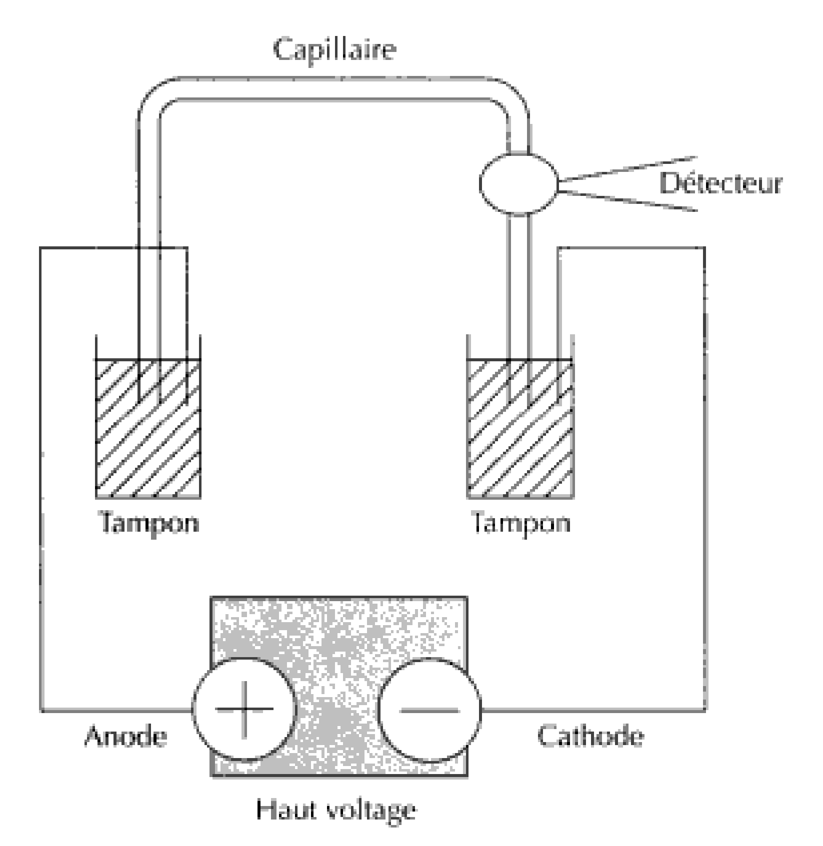



**Figure 7.** Schéma de l'appareillage de l'électrophorèse capillaire

opératoires sont fixées, l'électrophorégramme est reproductible. Les temps de migration constituent un critère d'identification des espèces, la surface corrigée des pics est proportionnelle à la quantité injectée. Cette méthode connaît un essor très important car elle offre une haute performance conduisant à un fort pouvoir de résolution sous une grande vitesse de séparation. La similitude entre électrophorégramme et chromatogramme explique l'extension à l'électrophorèse du langage chromatographique.
Temps de migration = temps mis par le soluté pour parcourir la longueur effective $\ell$ (distance entre injecteur et détecteur), correspond au temps de rétention de la chromatographie.

$$t = \frac{\ell}{\mu_{app.}E} = \frac{\ell L}{\mu_{app.}V}$$

L'efficacité du système est appréciée en nombre de plateaux théoriques au mètre ($10^5$ à $10^6$ plateaux au mètre) par comparaison du temps de migration à la déviation standard des pics. Les performances de l'électrophorèse capillaire dépassent souvent celles de la chromatographie capillaire, d'où le nom parfois utilisé de HPCE (*high performance capillary electrophoresis*). Elle s'applique aujourd'hui aussi bien aux ions de petite dimension qu'aux macromolécules, aussi bien qu'à des espèces neutres (contrairement aux notions liées à l'électrophorèse classique).

## B. Matériel

### 1. Système d'injection

On injecte quelques nanolitres selon un des deux procédés suivants :
- *électromigration* : une extrémité du capillaire et l'électrode sont plongées dans la solution à analyser. Une tension de 5-10 kiloVolts est appliquée pendant un temps court. La quantité injectée est fonction de la tension et du temps d'injection (les mobilités électrophorétiques différentes des divers analytes de l'échantillon peuvent induire une discrimination) ;
- *pneumatique par surpression* : on crée une surpression sous scellé à l'entrée du capillaire, plongeant dans la solution à analyser (dans ce cas il n'existe aucune discrimination au niveau de l'échantillon lors de l'injection).

Comme mentionné précédemment, le plus souvent, l'extrémité anodique est celle de l'injection (*cf.* plus loin).
La séparation est réalisée dans un compartiment thermostaté (condition nécessaire à la reproductibilité qualitative).

### 2. Détection

Le mode de détection le plus utilisé, comme en HPLC, est l'absorptiométrie. L'absorbance est mesurée à travers le capillaire lui-même, à un endroit rendu transparent. Le très faible diamètre du capillaire (25 à 100 µm) impose un système particulier de focalisation afin d'augmenter le chemin optique et, en conséquence,

la sensibilité. L'absorptiométrie peut être directe, lorsque les solutés absorbent dans l'UV-visible ou indirecte, dans le cas contraire. On ajoute, alors, au tampon un chromogène absorbant dans le visible, créant un bruit de fond mesurable. La présence des solutés se révèle par une diminution de l'absorbance. D'autres systèmes sont également utilisés : fluorimétrie (éventuellement laser), électrochimie… et aujourd'hui la spectrométrie de masse.

## 3. Avantages des capillaires

L'originalité de la technique, par rapport aux méthodes d'électrophorèse classique, réside dans le fait que la séparation est réalisée dans un capillaire de très faible diamètre. La surface de refroidissement est très grande, la dissipation de la chaleur produite, par effet joule, est très bonne. Les intensités électrophorétiques peuvent être grandes et, par suite, les tensions appliquées peuvent être de quelques dizaines de kilovolts. E étant intense, les vitesses de migration sont très grandes et les temps d'analyse peuvent être courts (5 à 10 minutes, voir équations précédentes).
La différence de température entre les parois et le cœur du capillaire est d'autant plus importante que le diamètre du capillaire est grand. Or à ces différences de température sont liées des différences de densité de solvant et de diffusion de l'échantillon. Plus le capillaire sera étroit, meilleure sera l'efficacité de la séparation.
Cette efficacité est chiffrée en nombre de plateaux. Elle est en HPCE de l'ordre de $10^5$ à $10^6$ plateaux au mètre. Les phénomènes de convection et de diffusion radiale sont limités, l'utilisation d'agents stabilisants n'est plus obligatoire. Pour l'électrophorèse de zone libre :

$$N = \frac{\mu_{app.} V}{2D_M} \cdot \frac{\ell}{L}$$

avec $D_M$ le coefficient de diffusion moléculaire de l'espèce considérée.
En effet, la seule contribution à l'élargissement de la bande échantillon étant la diffusion longitudinale (agitation thermique), la variance du pic électrophorétique ($\sigma_t^2$) au moment de son passage dans la cuve de détection est donnée par l'équation d'Einstein :

$$\sigma_t^2 = 2D_M \cdot t_m$$

avec $t_m$ le temps de migration de l'espèce considérée.

# C. Mode de transport

Dans les capillaires, les vitesses de migration résultent à la fois :
- de la migration ionique (électromigration) ;
- et d'un écoulement électro-osmotique (contrairement à l'électrophorèse classique où l'on doit éliminer ce phénomène. Il pourra être mis à profit pour les séparations).

À l'électromigration correspond la vitesse électrotrophorétique $\upsilon_{ep} = \mu_{ep} E$, c'est-à-dire la vitesse liée au rapport charge/taille de la molécule, avec $\mu_{ep} > 0$ pour les cations et $\mu_{ep} < 0$ pour les anions.
À l'écoulement électro-osmotique correspond une vitesse indépendante du rapport charge/taille des solutés. Il correspond au déplacement de la veine liquide sous l'effet du champ électrique. En effet, la surface du capillaire (formé de groupements silanols lorsqu'il est constitué de silice fondue vierge) s'ionise en groupement $SiO^-$ (et ceci d'autant plus que le pH de l'électrolyte est plus élevé, le pKa de la silice fondue étant de 5-6). La présence d'une interface solide-liquide chargée, négativement dans le cas présent, induit une répartition des ions constitutifs du tampon totalement différente au sein de la solution et à proximité de la paroi, à la suite de la création d'une double couche . Cela signifie qu'un excès de cations est présent au niveau de la couche diffuse ; ces cations, qui sont solvatés par des molécules d'eau se déplaçant vers la cathode sous l'effet d'un champ électrique appliqué tangentiellement à l'interface, entraînent de proche en proche grâce aux liaisons hydrogène *l'ensemble de la veine liquide depuis l'anode en direction de la cathode*. C'est le *phénomène d'électroendosmose* qui présente une mobilité $\mu_{eo}$. Son origine se trouvant à proximité des parois, son profil est plat et non parabolique comme dans toute technique chromatographique fondée sur l'élution (déplacement de la bande échantillon par déplacement de la phase mobile). Par suite, le flux électro-osmotique ne contribue pas en lui-même à l'élargissement de la bande échantillon mais joue un rôle considérable au niveau de la résolution des espèces analysées. Ainsi, en électrophorèse de zone libre, on peut établir, en partant de la définition du paramètre de la résolution entre deux pics :

$$R_s = \frac{2\,(t_{m_2} - t_{m_1})}{w_{b_2} + w_{b_1}}$$

et en faisant l'hypothèse réaliste, pour deux pics électrophorétiques contigus, que $w_{b2} + w_{b1} = 4\sigma_2$ :

$$R_s = \frac{1}{4\sqrt{2}} \cdot \Delta\mu \sqrt{\frac{V}{D_M(\bar{\mu} + \mu_{eo})} \cdot \frac{\ell}{L}}$$

avec $\Delta\mu$, la différence de mobilité électrophorétique des deux espèces considérées et $\bar{\mu}$, la moyenne arithmétique des mobilités électrophorétiques.
Aussi, et comme rapporté plus haut, la vitesse de déplacement d'un soluté donné dans le capillaire sera la somme $\upsilon_{eo} + \upsilon_{ep}$, $\upsilon_{ep}$ s'ajoutant à $\upsilon_{eo}$ lorsque le soluté est chargé positivement, $\upsilon_{ep}$ se retranchant à $\upsilon_{eo}$ lorsque le soluté est chargé négativement (*fig. 1*). Ainsi, en électrophorèse capillaire, les mobilités électrophorétiques mesurées correspondent pratiquement toujours à des mobilités électrophorétiques apparentes. De même que l'on utilise la notion de mobilité électrophorétique $\mu_{ep}$ ($\upsilon_{ep} = \mu_{ep} E$), on parle de mobilité électro-osmotique avec $\upsilon_{eo} = \mu_{eo} E$.
La vitesse électro-osmotique est donc proportionnelle au champ électrique imposé. L'influence importante du flux électro-osmotique dans un capillaire explique pourquoi le système d'injection est presque toujours placé du *côté de l'anode*, le flux électro-osmotique étant codirigé avec le champ électrique dans le cas d'un capillaire en silice vierge.

En pH acide, la densité de charge surfacique étant faible, le flux électro-osmotique sera faible, alors qu'en milieu basique et à faible force ionique, il sera important.

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon}{4\pi\eta}\zeta$$

Avec :
- $\varepsilon$ est la constante diélectrique
- $\eta$ est la viscosité du milieu électrophorétique
- $\zeta$ : le potentiel électrocinétique = $\frac{\sigma\delta}{\varepsilon_0\varepsilon}$,

  $\varepsilon_0$ étant la permittivité dans le vide, $\sigma$ la densité de charge surfacique et

  $\delta$ l'épaisseur de la double couche $\delta = \left[\frac{\varepsilon_0\varepsilon RT}{2[C]F^2z^2}\right]$

  où R est la constante des gaz parfaits, T la température absolue, [C] la concentration du tampon électrolytique, F la constante de Faraday et z l'état de charge des ions constitutifs du tampon.

Les biomolécules se chargent positivement par protonation et migrent vers la cathode. À pH élevé elles se chargent négativement. Dans ce cas, injectées à l'anode, elles ne devraient donc pas migrer. Or, elles sont détectées à la cathode. Ceci est dû au fait que : plus le pH augmente, plus la surface du capillaire s'ionise négativement, plus le flux électro-osmotique (migrant vers la cathode) devient important. En conséquence, dans les deux cas, les solutés sont donc détectables à la cathode.

*Remarque :* les groupements silanols de la paroi du capillaire sont aussi à l'origine de l'adsorption fréquente des protéines sur la paroi. La paroi du capillaire doit donc être modifiée pour étudier les protéines, les modifications de paroi permettent de réduire le flux électro-osmotique, de l'inverser (interface solide – liquide chargée positivement) voire de le supprimer (interface solide – liquide neutre). Ces modifications peuvent être réalisées de façon dite « statique » ou « permanente » par liaison covalente (silylation) ou par approche dite « dynamique » par ajout dans le milieu de séparation d'un agent capable de recouvrir la paroi puis d'être éliminé entre chaque séparation.

**En conclusion**, l'électrophorèse capillaire est utilisée pour séparer :
- les espèces ionisées ;
- les espèces neutres, ces dernières pouvant migrer soit sous l'action du flux électro-osmotique, soit après leur avoir conféré une charge, par exemple par addition d'un tensioactif ionique à l'électrolyte. Ce tensioactif, en quantité suffisante (concentration supérieure à sa concentration micellaire critique) créant avec les espèces neutres analysées des interactions hydrophobes, leur confère une charge d'autant plus importante qu'elles sont plus hydrophobes.

L'expression de la résolution page précédente montre que les séparations sont d'autant plus efficaces que V est grand. Toutefois, on ne peut pas augmenter indéfiniment V sans augmenter L : plus le capillaire est court, plus la résistance électrique diminue, l'intensité du courant augmente et donc la chaleur produite par effet joule augmente tandis que la surface de déperdition du capillaire diminue (puisque L diminue). En effet, la puissance à dissiper par unité de longueur dérive des

lois classiques : P = Vi et V = Ri. Or la résistance dépend non seulement de la longueur et de la section du capillaire mais également de la nature chimique et de la concentration du tampon électrophorétique :

$$\frac{P}{L} = \frac{K \cdot C \cdot r^2 \cdot V^2}{L^2}$$

Avec :
- K la conductance de l'électrolyte,
- r le rayon du capillaire,
- C la concentration du tampon électrophorétique.

De plus le coefficient de diffusion $D_M$ des solutés dans le milieu liquide joue un rôle : plus $D_M$ est petit, plus la résolution est grande. Ainsi, les solutés de haute MM peuvent être efficacement séparés si la diffusion moléculaire est le facteur limitant l'élargissement de la bande.

## D. Modes de séparation et exemples d'applications

### 1. Électrophorèse capillaire de zone (« capillary zone electrophoresis », CZE)

L'électrophorèse en solution libre est réalisée en présence d'un flux électro-osmotique d'intensité variable, comme vu précédemment, avec un champ électrique constant et en tampon homogène (identique au niveau des réservoirs situés à l'entrée et à la sortie du capillaire). Cette méthode utilisable pour toutes les espèces chargées permet de séparer des petites molécules (ions, *fig. 8*) et des macromolécules (protéines sériques, *fig. 9*).

Les paramètres opératoires sont essentiellement le pH (afin de conférer des charges différentes, sous réserve que les pK des molécules analysées soient différents, et d'adapter l'intensité du flux électro-osmotique) et la force ionique (adaptation du flux électro-osmotique). Le recours à des cosolvants organiques peut également être envisagé dans cette éventualité. Dans le cas où le rapport charge-taille pour deux ou plusieurs analytes s'avère identique sur toute la gamme de pH, le recours à diverses stratégies de complexation peut être mis en œuvre (cyclodextrines neutres ou ioniques, natives ou non).

### 2. Électrophorèse capillaire en gel (« capillary gel electrophoresis », CGE)

*L'électrophorèse capillaire en gel désigne les techniques dans lesquelles des dérivés ionisés sont séparés dans un capillaire rempli d'un gel (polyacrylamide)* ou de polymères (dextrans, par exemple) utilisés à des concentrations supérieures à leur concentration critique. En effet, au-dessus de cette concentration critique, ces polymères s'interpénètrent et une action de tamisage s'effectue vis-à-vis de macromolécules. La facilité de mise en œuvre de ce procédé est un gros avantage comparativement au procédé classique de polymérisation, *in situ*, de monomères par réticulation. Les parois du capillaire sont traitées afin de suppri-

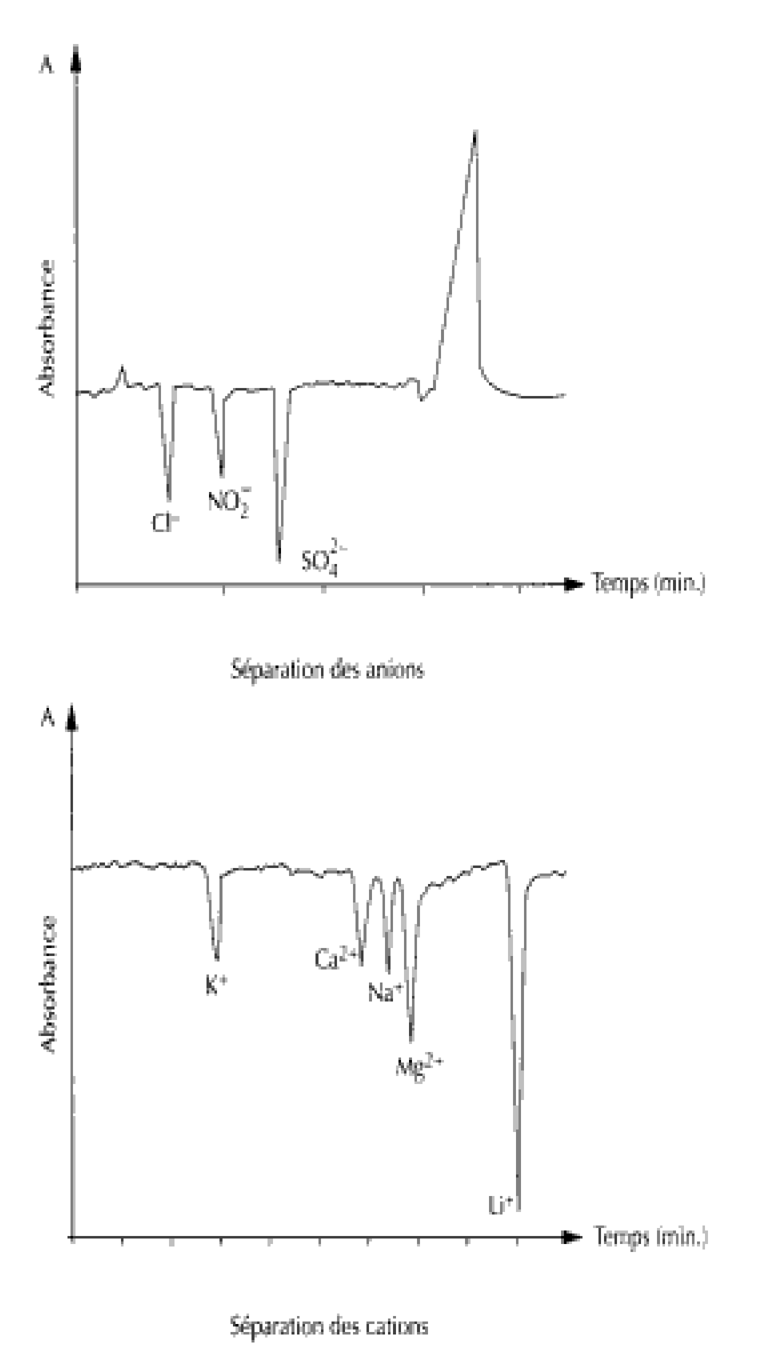



**Figure 8.** Séparations d'ions en électrophorèse capillaire (CZE) (détection UV-visible indirecte)

mer le flux électro-osmotique. Ainsi, seule l'injection électrocinétique des analytes s'avère possible (toute injection hydrodynamique conduisant à la destruction du gel). *Grâce à un effet de tamisage exercé par le gel, la CGE permet de séparer les molécules pour lesquelles le rapport masse-charge est constant quelle qu'en soit la taille (ADN : séparation de fragments de digestion figure 10, séquençage). Le gel peut être additionné d'un additif chiral (β-cyclodextrine, par exemple), la séparation des énantiomères peut alors être obtenue en fonction de leur aptitude à former des diastéréoisomères transitoires,* bien que d'autres approches de mise en œuvre plus aisées soient utilisées en énantioséparation (chromatographie micellaire électrocinétique avec des micelles chirales ou des sels biliaires, notamment).

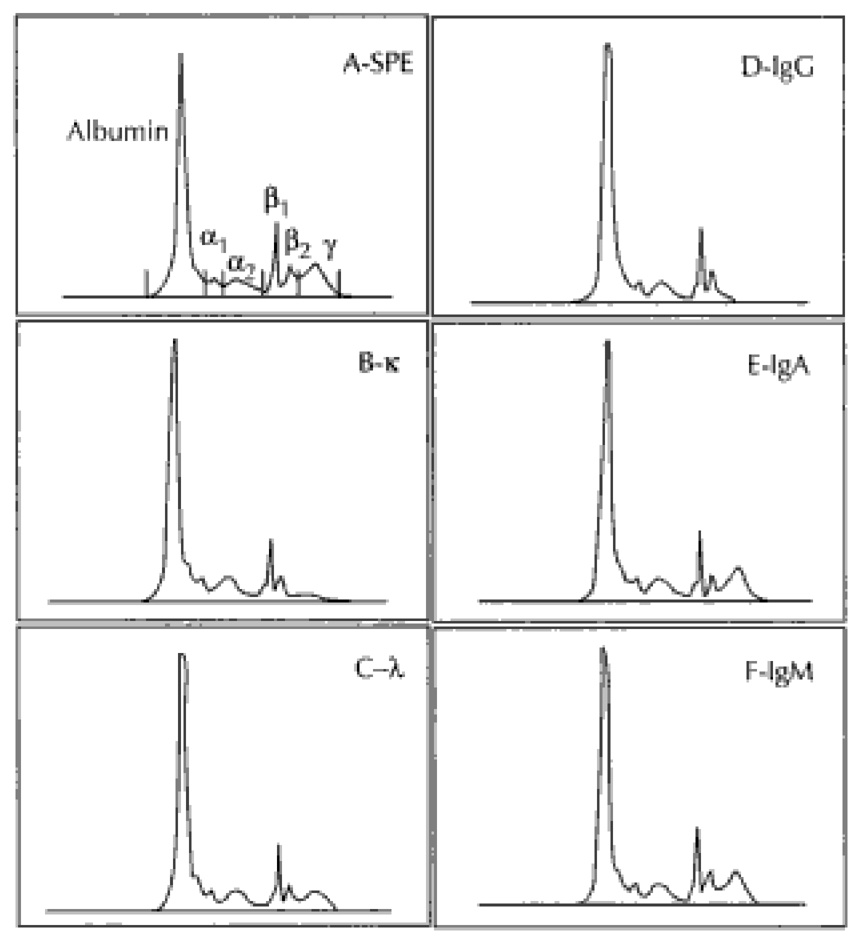



**Figure 9.** Séparation des protéines. (A) CZE sérum normal, (B)-(F) immunosoustraction capillaire après incubation avec les antichaînes légères κ et λ et les antichaînes lourdes G, A, M

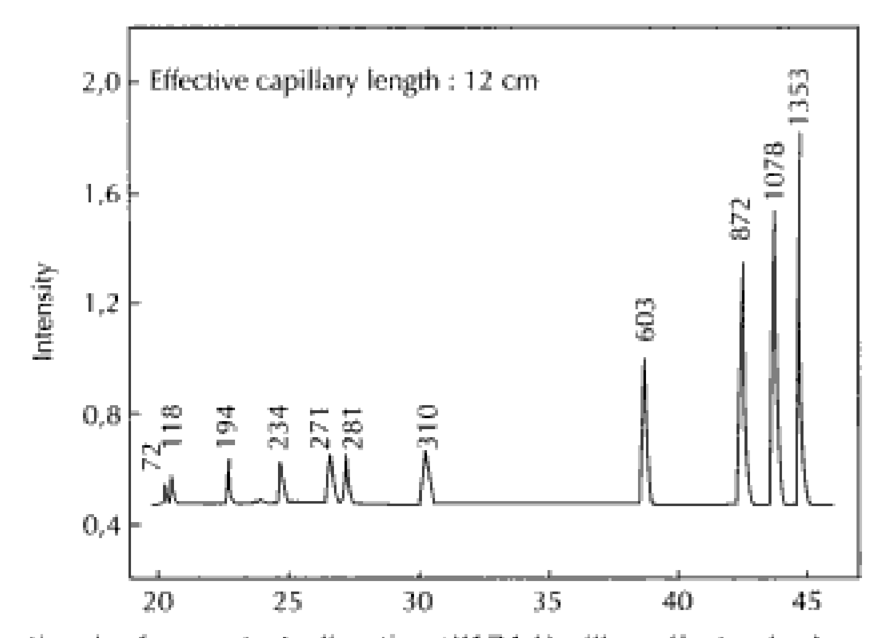



**Figure 10.** Séparation des fragments de digestion φX174-HaeIII par électrophorèse capillaire en gel

## 3. Électrophorèse capillaire à l'état stationnaire

### a) Isofocalisation capillaire (« Capillary Isoelectricfocusing », CIEF)

Cette technique s'applique uniquement aux molécules amphotériques, c'est-à-dire des molécules présentant un point isoélectrique (pI, valeur du pH pour laquelle l'état de charge global de la molécule est nul et par voie de conséquence sa mobilité éléctrophorétique aussi). Il s'agit d'une transposition de l'isofocalisation en gel dans des capillaires à surface modifiée, afin de supprimer le flux électro-osmotique. On peut procéder en deux étapes (CIEF en deux étapes) : une première de focalisation, suivie d'une seconde de mobilisation. Le flux électro-osmotique est supprimé et la mobilisation est réalisée en maintenant un haut voltage afin de prévenir la distorsion des zones. Très résolutive, la méthode est applicable à la séparation des hémoglobines (*fig. 11*).

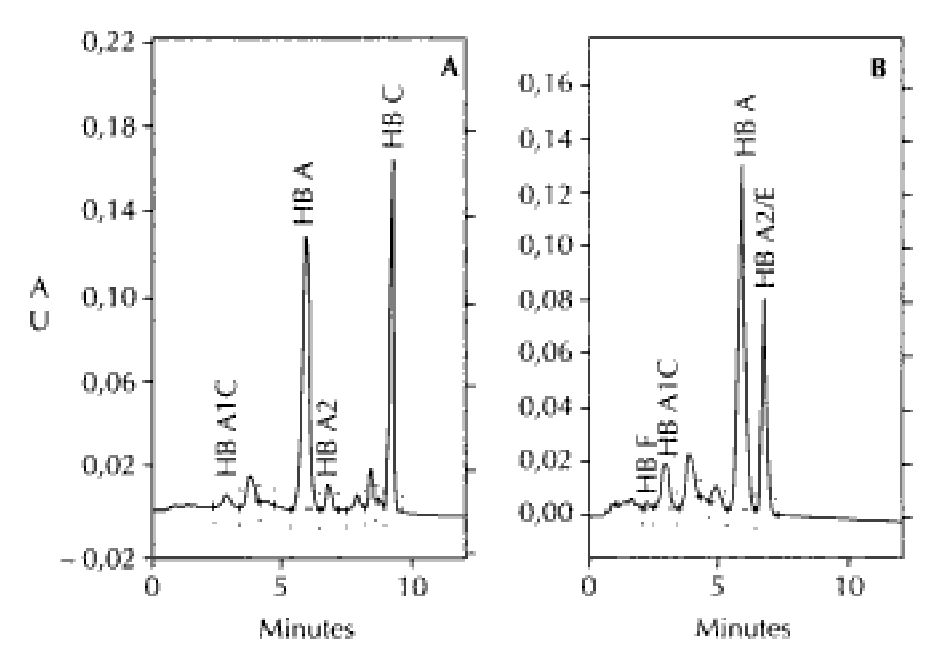



**Figure** 11. Séparations des Hb normales et anormales par CIEF en deux étapes

On peut aussi procéder en une étape (CIEF en une étape) : la focalisation et la mobilisation sont simultanées. Le flux électro-osmotique est diminué et contrôlé, la mobilisation se produisant sous son action et ne devant pas être trop rapide pour que les protéines puissent focaliser. Comme en IEF en gel, le gradient de pH est généré au moyen d'ampholytes (acides polyaminocarboxyliques) couvrant une large gamme de points isoélectriques dissous dans l'électrolyte de séparation. Dans un champ électrique, ces ampholytes migrent dans le capillaire tant qu'ils sont chargés. Le réservoir anodique est rempli d'une solution de pH inférieur au pI de l'ampholyte le plus acide (en général, il s'agit d'une solution d'acide phosphorique) tandis que le réservoir cathodique contient une solution dont le pH est supérieur au pI de l'ampholyte le plus basique (en général une solution d'hydroxyde de sodium). Au cours de la focalisation, il est possible d'empêcher les protéines de précipiter à leur pI en ajoutant du glycérol, de l'urée ou bien encore des tensioactifs. (Attention ! L'urée peut dénaturer les protéines en fonction de sa concentration.)

L'injection des analytes peut être réalisée selon deux modes :

- injection séquentielle : tampon de tête, puis les ampholytes, l'échantillon mélangé aux ampholytes, de nouveau les ampholytes seuls et le tampon de queue. Dans ce mode d'injection, le volume d'échantillon doit être faible afin de ne pas entraîner localement une trop grande perturbation du pH ;
- injection en une étape : l'échantillon mélangé aux ampholytes est introduit dans le capillaire par surpression, voire par dépression.

Comme pour les autres techniques développées en électrophorèse capillaire, les champs mis en œuvre sont très élevés, de l'ordre de 300 $V.cm^{-1}$ à 1 000 $V.cm^{-1}$.
*Le degré de résolution ΔpI dépend du gradient de pH*, le pouvoir de résolution étant d'autant plus précis que la gamme de pI des ampholytes est plus restreinte (dpH/dx). Il dépend également de la *vitesse de focalisation* (dμ/dx), les mobilités électrophorétiques des espèces analysées devenant de plus en plus réduites au fur et à mesure qu'elles atteignent la zone du gradient de pH correspondant à leur pI. Enfin, deux autres paramètres interviennent également : *le champ électrique E* et les *coefficients de diffusion moléculaires des espèces analysées* $D_M$. Toutefois, lorsque l'état stationnaire est atteint, la diffusion moléculaire n'a aucune conséquence sur la largeur des bandes échantillons puisque tout écart dans le positionnement des analytes par rapport à leur pI dans le gradient de pH est annihilé par le phénomène de focalisation qui prend de nouveau place. *Le pouvoir de résolution dépend donc essentiellement du gradient de pH induit par les ampholytes introduits dans le capillaire.*

### b) Isotachophorèse capillaire (« capillary isotachophoresis », CITP)

Cette technique nécessite la suppression du flux électro-osmotique puisqu'il est nécessaire que l'état stationnaire soit atteint, comme dans le cas de la CIEF. Toutefois, dans le cas présent, cet état stationnaire ne correspond pas à un état de charge nulle pour tous les analytes mais à leur déplacement à *vitesse électrophorétique identique*, d'où la dénomination de cette technique. Elle ne s'applique qu'à des substances ionisées homogènes au plan des charges, c'est-à-dire *soit à des anions soit à des cations*. Par suite, il n'est pas envisageable avec cette technique de séparer simultanément des anions et des cations en une seule injection comme on est capable de le faire en CZE. Elle est réalisée en plaçant l'échantillon entre deux électrolytes, un ion meneur rapide qui possède une mobilité électrophorétique supérieure à celles des composés à analyser et un ion terminal lent qui possède une mobilité électrophorétique inférieure à celle des analytes.
Pour comprendre comment s'établit cet état stationnaire nous envisagerons la séparation d'un mélange de deux cations avec $\mu_{ep1} > \mu_{ep2}$. Dans ces conditions, le tampon meneur sera généralement constitué par des protons, qui sont des cations très rapides. En ce qui concerne la constitution du tampon terminal, le choix n'est pas aussi simple et dépendra étroitement de la valeur de la mobilité électrophorétique du cation 2, le moins rapide au niveau du mélange analysé. Par conséquent, nous sommes en présence d'un ensemble de trois conducteurs montés en série (à savoir, le tampon meneur, le mélange des deux analytes et le tampon terminal) dont les résistances vont croissant, depuis le tampon meneur jusqu'au tampon terminal. En effet, pour des solutions, leurs résistances sont inversement proportionnelles à leurs conductances, donc aux mobilités électrophorétiques des espèces

constitutives. L'intensité du courant électrophorétique étant constante à travers tout le capillaire, la loi d'OHM :

$$V = Ri$$

impose qu'un gradient de champ soit présent depuis le tampon meneur (le plus conducteur) jusqu'au tampon terminal (le moins conducteur) (*fig. 12 A*, E1 < E2 < E3).

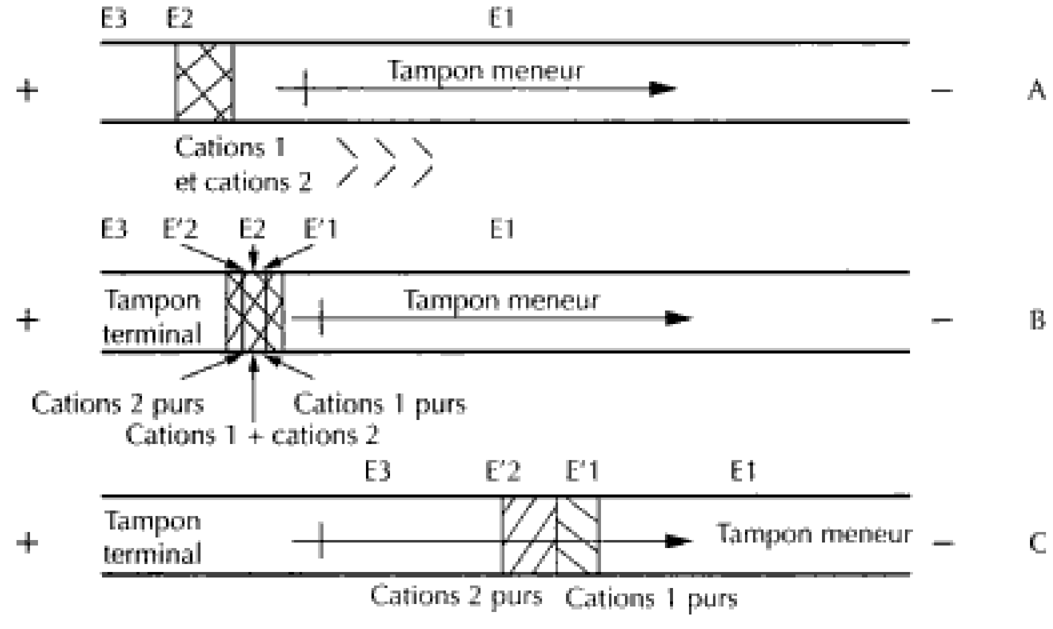



**Figure 12.** Schéma de principe de l'isotachophorèse capillaire, cas de la résolution d'un mélange de 2 cations

Sous l'effet de la tension appliquée aux extrémités du capillaire (*fig. 12 B*), deux phénomènes prennent place simultanément :

- déplacement global des bandes échantillons en direction de la cathode ;
- début de séparation des analytes puisque, effectivement, les cations 1 et 2 en mélange se trouvent dans une seule bande soumise initialement au champ E2. Les cations 1 présentant une mobilité électrophorétique supérieure à la mobilité électrophorétique moyenne des cations 1 et 2 en mélange migrent en avant, tandis que les cations 2 séparés, qui présentent une mobilité électrophorétique non seulement inférieure à celle des cations 1, mais également à la mobilité électrophorétique moyenne de la bande correspondant au mélange des cations 1 et 2, migrent en arrière de ces 3 espèces distinctes (cations 1 puis cations 2 pures et cations 1 + 2 en mélange). En effet, les vitesses de migration peuvent être obtenues à l'aide des équations suivantes :

$$\upsilon_1 = \mu_1 \, E2$$

$$\upsilon_{1,2} = \mu_{1,2} \, E2$$

$$\upsilon_2 = \mu_2 \, E2$$

avec $$\mu_1 \mu_{1,2} > \mu_2$$

Ainsi, dès le début de la résolution du mélange des deux cations ne sommes-nous plus en présence de trois conducteurs montés en série mais de cinq (*cf.* fig. 12B), ceux-ci présentant des résistances toutes différentes et allant toujours croissant

depuis le tampon meneur jusqu'au tampon terminal, au vu des mobilités électrophorétiques constitutives de ces cinq zones du capillaire :

$R_{1(\text{tampon meneur})} < R'_{1(\text{cations 1 purs})} < R_{1,2(\text{cations 1+2})} < R'_{2(\text{cations 2 purs})} < R_{3(\text{tampon terminal})}$.

Une telle situation induit à son tour l'existence d'un gradient de champ allant croissant, depuis la zone correspondant au tampon meneur jusqu'à celle correspondant au tampon terminal, et comprenant maintenant cinq secteurs :

$$E1 < E'1 < E2 < E'2 < E3$$

Aucun remélange ne peut avoir lieu au niveau de ces différentes bandes, sous l'effet de la diffusion moléculaire, en raison de l'existence du gradient de champ électrique rapporté ci-dessus. En effet, si par hasard l'un des cations 1 séparés diffusait dans la bande du tampon meneur, il serait obligatoirement ralenti puisqu'il entrerait dans une zone présentant un champ électrique inférieur à celui de la zone correspondant à ses homologues séparés :

$$\text{car} \quad E1 < E'1$$

De même il est impossible qu'un cation 1 séparé puisse réintégrer la bande initiale d'échantillon (cations 1 + 2 en mélange) sous l'effet de la diffusion moléculaire. En effet, si une telle éventualité survenait, il serait alors réaccéléré, conduisant ainsi à sa réintégration dans la bande correspondant aux cations 1 séparés, puisque, conformément à la figure 12B :

$$E'1 < E2$$

Un raisonnement identique pouvant être réalisé au niveau de la bande correspondant aux cations 2 séparés, on comprend aisément que, progressivement, la seule évolution possible, au fur et à mesure que les bandes constitutives de la veine liquide présentes au sein du capillaire se déplacent en direction de la cathode, consiste en la résolution progressive et totale du mélange cations 1 + cations 2 en deux bandes distinctes (*fig. 12 C*), puisque les équations suivantes :

$$\upsilon_1 = \mu_1 \, E2$$

$$\upsilon_{1,2} = \mu_{1,2} \, E2$$

$$\upsilon_2 = \mu_2 \, E2$$

sont toujours valables jusqu'à ce que les deux derniers cations 1 et 2 soient effectivement séparés.

Finalement, tous les cations présents dans la veine liquide et possédant des mobilités électrophorétiques différentes se trouvent empilés selon celles-ci puisque ceux qui présentent une mobilité électrophorétique élevée se trouvent dans une zone de champ électrique faible, tandis que ceux qui ont au contraire une mobilité électrophorétique faible se déplacent dans une zone de champ électrique élevé. Ainsi l'état stationnaire est-il atteint (*fig. 12 C*) quand :

$$\mu_{(\text{tampon meneur})} \cdot E1 = \mu_{1(\text{cations 1})} \cdot E'1 = \mu_2 \cdot E'2 = \mu_{(\text{tampon terminal})} \cdot E3$$

soit quand toutes les espèces cationiques constituant la veine liquide se déplacent à la même vitesse.

Enfin, il est évident qu'au moyen d'un raisonnement identique on expliquerait la résolution d'un mélange d'anions présentant des mobilités électrophorétiques différentes, sous réserve de choisir un tampon meneur et un tampon terminal dont

les anions présenteraient respectivement des mobilités électrophorétiques supérieures et inférieures à toutes celles des anions que l'on désire séparer.
Actuellement, cette méthode est plus souvent utilisée, sous une approche simplifiée, comme technique de concentration des échantillons.

## 4. Chromatographie capillaire électrocinétique micellaire (« micellar electrokinetic capillary chromatography », MEKC)

Cette approche a été développée à l'origine pour résoudre des mélanges de molécules non potentiellement ionisables. Leur mobilité électrophorétique étant nulle, une différenciation dans leur vitesse de migration ne peut être obtenue que sous réserve de leur *conférer une charge*.
Dans un capillaire en silice fondue, le flux électro-osmotique est codirigé avec le champ électrique, les équations rapportées précédemment pour la résolution $R_s$ en CZE mettent en évidence que $R_s$ est plus élevée pour les anions, qui remontent à contre-flux électro-osmotique, que pour les cations, dont le sens de déplacement est codirigé avec le flux électro-osmotique. Ainsi, une charge positive aussi bien que négative pouvant être conférée aux analytes neutres, on leur confère en général une charge négative en les faisant interagir avec des micelles anioniques. En conséquence, dans ce type d'électrophorèse, des surfactants ioniques sont ajoutés au tampon à des concentrations excédant la concentration micellaire critique. À ces concentrations, les surfactants monomères tendent à former des agrégats grossiers et sphériques (micelles) présentant un groupement de queue hydrophobe orienté vers le centre et une tête chargée (donc hydrophile) se disposant le long de la surface externe au contact du tampon aqueux.
*Le surfactant* doit être nécessairement transparent aux UV (dans le cas d'une détection UV). *Sa concentration micellaire critique* (cmc) doit être connue avec précision et *le nombre d'agrégations de monomères* formant une micelle doit également être connu.
On utilise, le plus souvent, le surfactant anionique SDS (dodécylsulfate de sodium) qui répond à toutes ces exigences (cmc = 8,2 mM à 25 °C, n = 69).
Le système MEKC est composé de deux phases ou pseudo-phases : une phase aqueuse et une pseudo-phase micellaire. Les micelles ont donc, généralement, une charge nette négative qui leur confère une grande mobilité électrophorétique $\mu_{mic}$ vers l'anode. Cependant, dès que le tampon électrophorétique présente un pH > 2.5, un flux électro-osmotique dirigé vers la cathode prend naissance au sein du capillaire, $\mu_{eo}$ étant légèrement plus grand, en valeur absolue, que $\mu_{mic}$, le mouvement de la phase aqueuse en direction de la cathode est par suite plus rapide que celui de la phase micellaire. Ainsi, la phase micellaire est une phase *pseudo-stationnaire* et, pour des molécules neutres, il existe une *fenêtre de séparation*. En effet, aucune molécule neutre ne peut éluer avant le flux électro-osmotique, ni après le temps de migration de la phase micellaire.

- $t_{eo}$ est repéré à l'aide de méthanol, molécule neutre qui ne se micellise pas ;
- tandis que $t_{mic}$, au contraire, est marqué à l'aide d'une molécule neutre qui se micellise totalement, quelles que soient les conditions opératoires. Pour y parvenir, on utilise le rouge Soudan III.

Les solutés se partageant entre ces deux phases présenteront des temps de rétention compris entre $t_{eo}$ et $t_{mic}$. Plus une substance sera hydrophobe, plus elle sera retenue et son temps de migration se rapprochera de $t_{mic}$.
La rétention en MEKC est généralement fondée sur l'hydrophobie. Il est possible de définir un coefficient de distribution, comme en chromatographie liquide, ainsi qu'un facteur de rétention.

$$K_X = \frac{[X]_{mic}}{[X]_{aq}} \quad \text{et} \quad k_X = \frac{q^x_{mic}}{q^x_{aq}} = K_X \cdot \frac{V_{mic}}{V_{aq}}$$

- avec $[X]_{mic}$ et $[X]_{aq}$, les concentrations du soluté X respectivement en phase micellaire et en phase aqueuse ;
- $q^x_{mic}$ et $q^x_{aq}$, les quantités d'échantillon X respectivement en phase micellaire et en phase aqueuse ;
- et $V_{mic}$ et $V_{aq}$, les volumes de phases micellaire et aqueuse présents dans le capillaire.

Partant de l'équation qui définit le facteur de rétention, rapportée ci-dessus, et en appliquant la théorie asymptotique (temps de l'échange du soluté entre les deux phases extrêmement court par rapport au temps de l'analyse), on démontre que $k_x$ peut encore s'écrire :

$$k_x = \frac{t_{r_x} - t_{eo}}{t_{eo} \cdot \left(1 - \frac{t_{r_x}}{t_{mic}}\right)}$$

avec $t_{rx}$, le temps de rétention du composé X. Enfin, comme précédemment pour la CZE, partant de l'équation permettant de calculer la résolution entre deux pics consécutifs sur l'électrophorégramme, nous pouvons établir la relation entre le paramètre de résolution $R_s$ et les paramètres opératoires que l'on doit optimiser, c'est-à-dire : l'efficacité du système N, la sélectivité chromatographique $\alpha$, les facteurs de rétention $k_a$ et $k_b$ des composés constituant la paire pour laquelle on calcule $R_s$, ainsi que la fenêtre de séparation :

$$R_s = \frac{1}{4}\sqrt{N} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k_b}{1 + k_b} \cdot \frac{1 - \frac{t_{eo}}{t_{mic}}}{1 + k_a \cdot \left(\frac{t_{eo}}{t_{mic}}\right)}$$

On peut noter que lorsque $t_{mic}$ tend vers l'infini, le dernier terme, qui correspond à la *fenêtre de séparation, tend vers 1* et la formule ci-dessus devient identique à la formule bien connue de l'équation générale de la résolution, développée pour la chromatographie en phase liquide. Il est à noter que, dans ces dernières conditions, la phase micellaire devient alors véritablement stationnaire et la MEKC devient identique à la chromatographie en phase liquide à polarités de phase inversées. Ainsi, la chromatographie liquide en phase inverse est un cas particulier de la MEKC.

Les paramètres opératoires à optimiser sont donc :

- la nature et la concentration du tensioactif (ou éventuellement des micelles mixtes), afin de modifier la sélectivité et la rétention ;
- la nature et le pourcentage du cosolvant organique, modification du partage entre les deux phases – sélectivité et rétention – et adaptation de la fenêtre de séparation ;
- la force ionique et le pH du tampon, afin de modifier également la fenêtre de séparation ;
- la température (modification du partage entre phases et de l'intensité du flux électro-osmotique) ;
- enfin, la tension appliquée ainsi que la longueur et le diamètre du capillaire.

La méthode est en plein essor pour la séparation de petites molécules, les efficacités atteintes pour des molécules non vaporisables avoisinant celles obtenues en chromatographie phase gazeuse pour des analytes vaporisables, non thermodégradables.

L'utilisation de surfactants chiraux (séparation des isomères optiques) est une grande avancée pour l'industrie du médicament (exemple *fig. 13*).

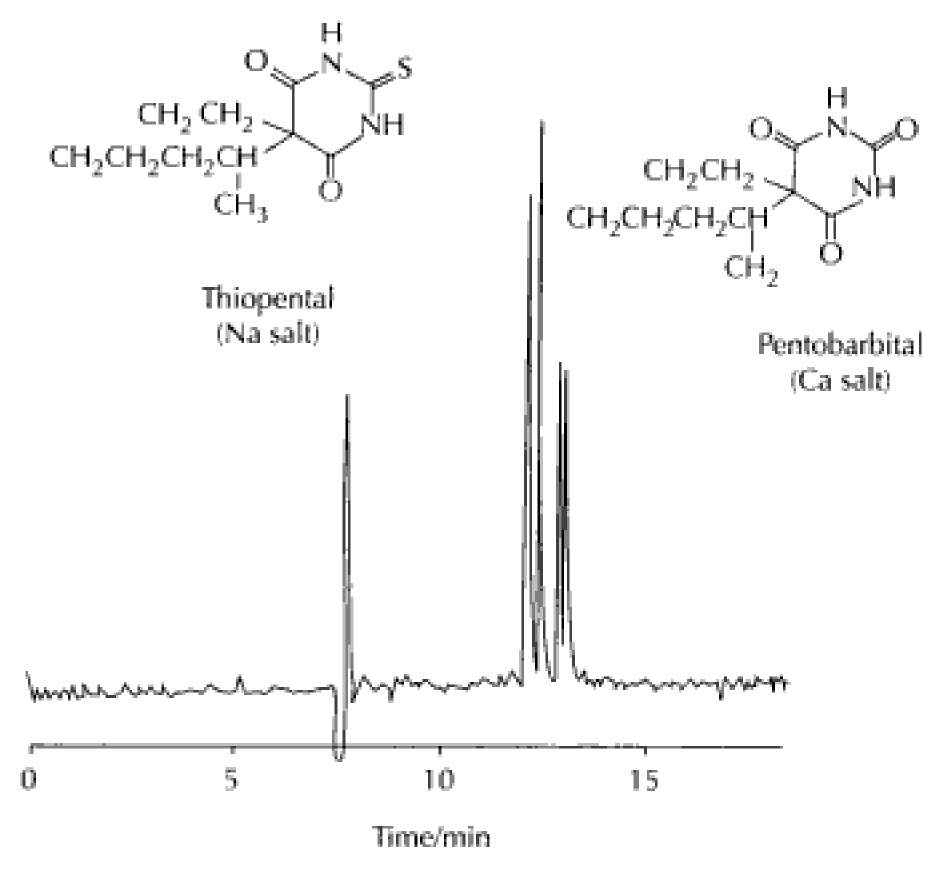



**Figure 13.** Séparation chirale du thiopental et du pentobarbital par MEkC en présence de β cyclodextrine et de d-camphore-10-sulfonate

## 5. Électrochromatographie (« Capillary electrochromatography », CEC)

L'électrochromatographie consiste en une électromigration d'espèces potentiellement ionisables et/ou d'espèces neutres, en capillaire rempli d'une phase stationnaire, de fine granulométrie 1 à 3 µm, voire de monolithes. Les phases stationnai-

res utilisées sont celles de la chromatographie liquide. Une très fine granulométrie est utilisable dans ce cas puisqu'il n'y a pas de perte de charge, le moteur du déplacement de la phase mobile étant l'électro-endosmose. Il s'agit d'une technique chromatographique miniaturisée et totalement intégrée, le capillaire remplissant simultanément le rôle de colonne, d'injecteur, de pompe et de détecteur. La difficulté principale réside dans la confection des colonnes (fabrication des frittés, si l'on utilise du gel chromatographique sphérique en tant que phase stationnaire, élaboration des monolithes). *Comme en chromatographie liquide, la séparation des solutés est fonction de la sélectivité induite par la phase stationnaire et la composition de la phase mobile, de la rétention et de l'efficacité du système chromatographique.*

De nouveau, il est possible de définir un facteur de rétention et un coefficient de distribution qui sont reliés entre eux selon l'expression :

$$k_X = \frac{q^x_{\varphi_{stat}}}{q^x_{\varphi_m}} = K_X \cdot \frac{V_{\varphi_{stat}}}{V_{\varphi_m}}$$

- avec $q^x_{\varphi_{stat}}$ et $q^x_{\varphi_m}$, la quantité d'échantillon respectivement en phase stationnaire et en phase mobile ;
- et $V_{\varphi_{stat}}$ et $V_{\varphi_m}$, le volume de phase stationnaire et le volume de phase mobile présents dans le capillaire.

Comme précédemment dans le cas de la MEKC, on peut établir, à partir de l'équation définissant le facteur de rétention et en appliquant la théorie asymptotique, des expressions permettant de calculer la valeur du facteur de rétention k à partir de l'électrophorégramme, que le soluté considéré soit ionique ou neutre. Ainsi, pour une molécule neutre on établit que :

$$k_x = \frac{t_{r_x} - t_{eo}}{t_{eo}}$$

$t_{r_x}$ étant le temps de rétention du soluté X considéré. Tandis que pour une espèce chargée, l'expression permettant de calculer son facteur de rétention devient :

$$k_x = \frac{t_{cec} - t_{cze}}{t_{cze}}$$

avec $t_{cec}$, le temps de rétention en CEC pour le soluté X et $t_{cze}$, son temps de migration en CZE, ce dernier étant donné par l'expression :

$$t_{cze} = \frac{\ell L}{(\mu_{eo} + \mu_{ep})\,V} \quad \text{d'où} \quad \frac{\ell}{t_{cze}} = \frac{\ell}{t_{eo}} + \frac{\ell}{t_{ep}}$$

On peut encore établir $k_x$ pour une molécule chargée en CEC :

$$k_x = \frac{t_{cec}\left(1 + \frac{\mu_{ep}}{\mu_{eo}}\right) - t_{eo}}{t_{eo}}$$

$\mu_{ep}$ et $\mu_{eo}$ étant respectivement la mobilité électrophorétique propre du soluté X considéré et $\mu_{eo}$, la mobilité de l'électro-endosmose. Grâce à cette nouvelle approche, on obtient des efficacités intermédiaires entre la chromatographie en phase liquide et la MEKC, avec l'avantage sur cette dernière d'être totalement compatible avec le couplage en ligne à la spectrométrie de masse.

# Conclusion

L'électrophorèse capillaire s'est développée de façon spectaculaire depuis ces dix dernières années dans les domaines de la biologie. Elle est devenue un outil très performant d'analyse en général puisqu'elle est aussi bien adaptée aux analyses des médicaments qu'aux analyses d'eaux (cations, anions, molécules organiques), à l'étude des milieux biologiques comme à celle des matrices alimentaires ou environnementales. Elle permet également de résoudre des séparations chirales par adjonction de réactif à propriétés chirales dans le milieu électrophorétique et s'est révélée être un banc d'essai très intéressant en vue du développement de phases stationnaires chirales pour la chromatographie en phase liquide.

## L'essentiel de la question

L'électrophorèse, initialement méthode d'analyse séparative appliquée aux molécules ionisées utilisant la migration dans un champ électrique, a vu son domaine d'application exploser récemment avec l'utilisation des capillaires. Ainsi, aujourd'hui, ne peut-on plus traiter de l'électrophorèse, mais doit-on parler des électrophorèses.

L'électrophorèse classique, reste un grand outil de la biologie, en particulier grâce au couplage de ce mode de séparation des molécules d'intérêt biologique sous l'action d'un champ électrique et à travers un support plus ou moins sélectif, avec : simultanément ou *a posteriori*, les méthodes modernes d'immunologie.

L'électrophorèse capillaire, en revanche, est une technique complémentaire des méthodes chromatographiques fondées sur l'élution et voit ses applications couvrir non seulement le monde de la biologie mais aussi tous les domaines de la chimie et du monde du médicament.

Comparativement l'HPLC, sa force réside dans le principe de déplacement des bandes d'échantillon combinant : l'électromigration et l'électroosmose. De ce fait, le facteur limitant la performance de l'HPLC (perte de charge en tête de colonne) n'existe pas. Par ailleurs, sa miniaturisation a, d'emblée, permis d'accéder à de grandes performances de séparation en des temps très courts. L'électrophorèse capillaire permet naturellement l'accès au même domaine biologique que l'électrophorèse classique ; mais l'électroosmose lui a ouvert la porte des applications aux molécules non ionisées, et l'utilisation de réactifs spécifiques lui a ouvert le champ des séparations chirales ou des analyses des molécules hydrophobes par exemple…

Enfin ses grandes performances séparatives et son couplage possible avec la spectrométrie de masse font de l'électrophorèse capillaire un outil de choix pour le développement de la protéomique.

***Pour en savoir plus***


- Melvin M. *Electrophoresis, analytical chemistry by open learning (ACOL)*. Londres, Wiley, 1987.
- Galteau M.-M., Arthur Y. Paris, Wolters Kluwer, « Moniteur Internat », 1990 : 17 ; 40-45
- Gareil P., Peltre G. « Électrophorèse. Techniques de l'ingénieur », in traité *Analyse et Caractérisation*, 1995 : p. 1815.
- Taverna M., Le Potier I., Morin Ph. *Électrophorèse capillaire : Principe, Appareillage, Applications*. Techniques de l'ingénieur. 2003 : dossiers P3365-67.

# L'exploration des métabolismes phosphocalcique et osseux

J.-C. SOUBERBIELLE, Service d'explorations fonctionnelles,
CHU Necker – Enfants malades, AP-HP, Paris.

*Les métabolismes phosphocalcique et osseux sont très solidement imbriqués, et leur exploration peut relever d'une stratégie commune. L'os est le réservoir essentiel de calcium du corps humain (> 99 % du calcium total de l'organisme). Par ailleurs, la concentration de calcium ionisé ($Ca^{++}$) dans les liquides extracellulaires est maintenue dans une fourchette très étroite (comprise entre 1,18 et 1,30 mM) grâce à une régulation des flux de $Ca^{++}$ entre le sérum et l'os, le rein et l'intestin. Ce contrôle très fin de l'homéostasie calcique persiste malgré les quantités très importantes de $Ca^{++}$ échangées de façon quasi permanente. Par exemple, pour 10 g de calcium filtrés chaque jour par le rein (et potentiellement perdus) 9,8 g sont réabsorbés.*

*Le maintien de l'homéostasie calcique est assuré par les hormones calcitropes. Ce maintien est si vital pour l'homme qu'il peut se faire au détriment du squelette. Ainsi, une altération du métabolisme phosphocalcique peut avoir des répercussions très importantes sur la masse osseuse. Dans ces conditions, toute exploration d'éventuelles pathologies osseuses impose d'effectuer un bilan phosphocalcique minimum. Toutefois, les domaines cliniques concernés par l'exploration phosphocalcique sont nombreux et dépassent largement le seul domaine osseux. Devant la persistance sans explications d'un ou de plusieurs symptômes associés à une hyper- ou une hypocalcémie, un bilan phosphocalcique doit être demandé. On peut noter que ces signes cliniques (tab. 1) sont d'une grande banalité.*

**Tableau 1.** Signes cliniques associés à une hypercalcémie ou à une hypocalcémie

| Hypercalcémie | Hypocalcémie |
|---|---|
| Signes neurologiques : troubles du sommeil et de la concentration, dépression, confusion, céphalées, coma.<br>Signes cardiaques : *diminution de l'espace QT sur ECG, bradycardie, arythmie.*<br>Signes gastro-intestinaux : constipation, diarrhées, nausées, vomissements, ulcères digestifs, pancréatite.<br>Signes rénaux : *polyuropolydipsie (associée à des symptômes gastro-intestinaux, peut ⇒ déshydratation ++), lithiase, néphrocalcinose.*<br>Autres signes : *prurit, douleurs osseuses, calcifications.* | Signes neuromusculaires : *paresthésies Chvostek+, tétanie, laryngospasme, bronchospasme.*<br>Signes cardiaques : *augmentation de l'espace QT sur l'ECG, tachycardie, troubles du rythme, polypnée (aggrave l'hypocalcémie ionisée* via *une alcalose respiratoire).* |

*Ce chapitre fait le point sur les paramètres d'exploration des métabolismes phosphocalcique et osseux. Il doit se lire en complément de « Métabolisme phosphocalcique ». Les marqueurs du remodelage osseux ont été séparés du reste du bilan phosphocalcique.*

# I. Paramètres de l'exploration phosphocalcique

## A. Bilan phosphocalcique de base

### 1. Dosage de calcium

#### a) Dans le sang

■ *Calcémie totale*

Le dosage peut être réalisé de façon indifférente sur sérum ou plasma hépariné (pour des raisons évidentes, les prélèvements sur EDTA sont à proscrire). Par ailleurs, il faut se méfier des prélèvements ictériques ou hémolysés. De nombreuses

méthodes de dosage existent : méthodes colorimétriques, spectrométrie d'absorption atomique, méthodes par fluorescence (calcéine), électrodes spécifiques. Tous les résultats sont naturellement à interpréter en fonction de l'âge :

- calcium total NN < 7 jours : 1,80-2,75 mM ;
- NN > 7 jours et < 3 mois : 2,00-2,75 mM ;
- nourrissons et enfants : 2,20-2,70 mM ;
- adultes : 2,25-2,55 mM.

L'existence d'une hypoalbuminémie pouvant être à l'origine d'une « fausse » hypocalcémie, la formule suivante peut être utilisée pour corriger la calcémie mesurée, en fonction de l'albuminémie :

$$\text{Ca corr (mM)} = \text{Ca tot. (mM)} + 0{,}02\ [40\text{-albumine (g/L)}]$$

En utilisant cette formule, une hypocalcémie modérée à 2,15 mM associée à une hypoalbuminémie modérée à 34 g/L devient, après correction, une calcémie normale à 2,27 mM.

### *Calcémie ionisée*

Le calcium ionisé ($Ca^{++}$) est la fraction biologiquement « active » du calcium. Elle correspond à 45 à 50 % du calcium total circulant dans une situation « normale », le reste étant lié à des protéines (albumine en particulier) ou complexé à des anions. La concentration du $Ca^{++}$ est très bien régulée et reste dans une fourchette étroite de concentrations (exemple de valeurs normales chez l'adulte : 1,18-1,30 mM). La fraction ionisée du calcium circulant dépend cependant de la protidémie, et plus particulièrement de l'albuminémie, et du pH (la liaison Ca-albumine augmente si le pH augmente, ce qui entraîne la diminution de la fraction ionisée du calcium). Sur le plan théorique, le dosage direct du $Ca^{++}$ devrait donc systématiquement remplacer la mesure de la calcémie totale. En pratique, l'existence d'importantes causes d'erreurs préanalytiques doit impérativement tempérer cette idée. En effet, le prélèvement pour la mesure du $Ca^{++}$ doit être traité comme un prélèvement pour gaz du sang : prélèvement en anaérobiose et dosage effectué rapidement après le prélèvement (bien que l'on puisse théoriquement différer la mesure si le prélèvement est resté en anaérobiose totale). Le non-respect de ces conditions expose à de nombreuses erreurs d'interprétation.
Les appareils de dosage proposent une correction du $Ca^{++}$ mesuré, en fonction du pH de l'échantillon, et peuvent également calculer une concentration de $Ca^{++}$ pour un pH normalisé de 7,40, ce qui peut être intéressant pour pallier une éventuelle erreur préanalytique. Toutefois, si le patient présente un pH réellement très différent de 7,40, le risque d'erreur devient très important. Dans ces conditions, il convient de ne faire le dosage du $Ca^{++}$ que si l'on est sûr de contrôler les risques d'erreurs préanalytiques. Dans ce cas, on utilisera la mesure du $Ca^{++}$ au pH du patient et non pas la valeur corrigée pour un pH de 7,40.

## b) Dans les urines

### *Recueil*

Le recueil (urines de 24 heures, seconde miction du matin à jeun, minutée ou non) doit être effectué dans un récipient décalcifié sans antiseptique. Les urines doivent être acidifiées (pH < 4,5) par de l'HC1 1N puis impérativement homogénéisées. Les méthodes de dosage sont les mêmes que celles qui sont utilisées pour le calcium total dans le sang.

■ *Expression des résultats*

Les résultats sont exprimés en mg ou mmoles/24 h (mg ou mmoles/kg/24 h chez l'enfant). Les valeurs usuelles sont les suivantes :

| | | |
|---|---|---|
| • < 250 mg/24 h | chez la femme | (1,5-6,5 mmol/24 h) |
| • < 300 mg/24 h | chez l'homme | (2-7,5 mmol/24 h) |
| • environ 4 mg/kg/24 h | chez l'enfant et l'adulte | |

(1 mmole = 40 mg)

On peut également exprimer les résultats en fonction de la créatininurie (mmoles/mmoles). Si ce rapport est déterminé sur la deuxième urine du matin à jeun (valeur normale : < 0,35), il représente un indice de la quantité de calcium libérée par l'os (résorption osseuse). Cependant, la disponibilité des dosages des marqueurs osseux modernes (voir *plus loin*) rend cet index obsolète comme marqueur de la résorption osseuse. Enfin, si une hypercalciurie est détectée, il faut l'interpréter en tenant compte du contexte alimentaire du patient : une dissociation entre une hypercalciurie des 24 heures (représentant un excès d'entrée de calcium dans le liquide extracellulaire sans que l'on puisse savoir s'il vient principalement de l'os ou de l'intestin) et une calciurie normale sur les urines de jeûne et/ou une hypercalciurie associée à une hypernatriurie doivent en faire suspecter fortement une origine alimentaire (alimentation riche en produits laitiers mais aussi en protéines ou en sel).

## 2. Dosage des phosphates

### a) Dans le sang

Le dosage correspond aux phosphates $(PO_4)^{3-}$ inorganiques du sérum.

■ *Précautions préanalytiques*

Le dosage peut être effectué sur sérum ou plasma hépariné. Les autres anticoagulants, EDTA, citrate, oxalate sont à proscrire pour causes d'interférences dans la réaction colorimétrique. Les prélèvements hémolysés doivent être rejetés car les hématies sont beaucoup plus riches en $(PO_4)^{3-}$ que le sérum. Plus généralement, la phosphatémie est artificiellement augmentée en cas de prise de sang difficile, de garrot maintenu trop longtemps ou de retard à la centrifugation. Par ailleurs, l'ingestion d'aliments entraîne la diminution des phosphates sériques (formation de phosphate de calcium et dépôt sur l'os liés à l'augmentation du pH, d'une part, utilisation pour la phosphorylation du glucose et son stockage sous forme de glycogène dans le foie et les muscles, d'autre part).

■ *Dosage*

La méthode la plus utilisée est la mesure spectrophotométrique du phosphomolybdate formé en milieu acide.

■ *Expression des résultats*

Les valeurs usuelles des phosphates sériques varient avec l'âge :

| | |
|---|---|
| • nouveau-né < 7 j | 1,15-2,50 mM |
| • nouveau-né > 7 j | 1,35-2,30 mM |
| • nourrisson | 1,50-2,30 mM |

- enfant 1,30-1,85 mM
- adulte 0,80-1,50 mM

### b) Dans les urines

La phosphaturie dépend essentiellement des apports alimentaires en phosphore mais aussi de la filtration glomérulaire. De ce fait, on préfère exprimer la phosphaturie en fonction du comportement rénal vis-à-vis de la réabsorption des phosphates par les index suivants :

- TRP (taux de réabsorption des phosphates)

$$= 100 \times \left(1 - \frac{\text{phosphaturie} \times \text{créatininémie}}{\text{phosphatémie} \times \text{créatininurie}}\right)$$

Valeurs usuelles : 85-95 (%)

- TmPO4/DFG (capacité maximale de réabsorption des phosphates). Cet index se calcule à partir de la phosphatémie à jeun et du TRP en utilisant le nomogramme de Bijvoet et Walton.

Valeurs usuelles : 0,77-1,4
Un TmPO4/DFG bas témoigne d'une fuite rénale de phosphates.

## B. Hormones calcitropes

On entend par « hormones calcitropes » les différents facteurs systémiques qui régulent les concentrations et les flux de calcium et de phosphate dans l'organisme et dont la sécrétion est soumise à un rétrocontrôle par ces mêmes ions. Il s'agit essentiellement de la parathormone, ou hormone parathyroïdienne (PTH), et des métabolites de la vitamine D. La calcitonine peut également être considérée comme une hormone calcitrope bien que sa fonction physiologique ne soit pas clairement définie. On peut également évoquer, par analogie et du fait de son rôle dans la genèse des hypercalcémies humorales malignes, la substance PTH-like ou PTH-rP.

## 1. Hormone parathyroïdienne (PTH)

### a) Structure

L'hormone parathyroïdienne est un peptide monocaténaire de 84 acides aminés (sécrétés par les glandes parathyroïdes). Le gène de la PTH est situé sur le chromosome 11 et code pour une protéine de 115 acides aminés (aa), la prépro-PTH, qui après clivage donne naissance à la pro-PTH (90 aa) puis à la PTH proprement dite. L'activité biologique hypercalcémiante de la PTH est localisée dans sa partie N-terminale (1-34).

### b) Sécrétion

Le principal élément régulateur de la sécrétion de PTH est la concentration de calcium dans le liquide extracellulaire. Les variations de concentration en $Ca^{++}$ sont détectées par un récepteur sensible au calcium (*Ca-sensing receptor*) localisé sur la membrane des cellules parathyroïdiennes.

Les concentrations sériques de PTH présentent des variations circadiennes avec un maximum au cours de la nuit et un minimum l'après-midi. D'autres facteurs influencent la sécrétion de PTH, comme le calcitriol (inhibiteur), les prostaglandines et le magnésium (une hypomagnésémie chronique induit une hypoparathyroïdie fonctionnelle réversible à la correction de la carence).

### c) Effets cellulaires

Les effets cellulaires de la PTH s'exercent après liaison à des récepteurs de surface sur les cellules cibles. Le récepteur de la PTH (PTHR1) appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G tout comme le *Ca-sensing receptor* ou le récepteur de la calcitonine. Il a été mis en évidence pour ce récepteur des anomalies sélectives à certains tissus, par exemple au cours de la pseudohypoparathyroïdie de type Ib (PTH élevée avec lésions osseuses pour laquelle l'anomalie correspond à un défaut de synthèse du récepteur au niveau rénal mais pas au niveau osseux). Dans chacun de ses deux tissus cibles principaux (os et rein), la liaison de la PTH à son récepteur induit l'activation à la fois de l'adényl cyclase (avec production d'AMP cyclique) et de la phospholipase C (avec production d'IP3). Dans l'os, les récepteurs sont présents à la surface des ostéoblastes (et pas des ostéoclastes) qui, grâce à la production de facteurs locaux, régulent la fonction ostéoclastique. Au niveau du rein, la PTH exerce trois actions principales :
- elle réduit la réabsorption tubulaire proximale des phosphates ;
- elle augmente la réabsorption tubulaire distale du calcium ;
- elle augmente l'activité de la 1α-hydroxylase permettant la transformation de la 25-hydroxyvitamine D (25 OH D) en 1,25-dihydroxyvitamine D [1,25(OH)2 D] ou calcitriol dans les cellules du tubule proximal.

En outre, elle diminue également la réabsorption proximale des bicarbonates, ce qui entraîne une acidose hyperchlorémique modérée dans les situations d'hyperparathyroïdie.

### d) Dosage de la PTH

Le développement d'immunodosages de la PTH a considérablement facilité la prise en charge des patients présentant des troubles de la calcémie. Il ne faut toutefois pas méconnaître les limites de ces dosages sous peine d'importantes erreurs d'interprétation. En effet, de très nombreuses formes moléculaires de PTH peuvent être présentes dans la circulation. Le premier dosage de PTH de seconde génération, le dosage Allegro, est apparu sur le marché en 1987. Ce dosage ne mesure pas les fragments C-terminaux ou médians qui étaient détectés par les dosages de première génération et perturbaient l'interprétation des résultats. Au cours des années suivantes, plusieurs dosages semblables, IRMA ou immunodosages automatisés n'utilisant pas la radioactivité, sont devenus disponibles. Comme on pensait que ces techniques ne connaissaient que la PTH 1-84, elles ont globalement été appelées « dosages de PTH intacte ». En 1998, il a été démontré que ces dosages de PTH intacte reconnaissent aussi, avec des réactions croisées diverses (de 50 à 100 %), une molécule différente de la PTH 1-84, dont le profil d'élution en HPLC est proche de celui de la PTH 7-84 synthétique. En 1999, la société Scantibodies Laboratories a développé la première technique de dosage, dite « de troisième génération », ne reconnaissant pas la PTH 7-84. Cette technique produit des concentrations séri-

ques plus faibles que la technique Allegro, mais des valeurs équivalentes lorsque l'on teste des dilutions de PTH 1-84 synthétique. On a donc pensé que lorsque la PTH est dosée avec une technique de deuxième génération et une de troisième génération, la différence entre les deux valeurs correspond à la concentration de la PTH 7-84. Il a ensuite été montré que le pourcentage de PTH 7-84 augmente lorsque le débit de filtration glomérulaire diminue. Un travail publié en 2000 a apporté de nouvelles informations sur le rôle potentiel de la PTH 7-84 et a suscité de nouvelles questions. Ce travail montrait que :

- chez des rats parathyroïdectomisés recevant un régime pauvre en calcium, la PTH 7-84 synthétique inhibe l'effet hypercalcémiant et hyperphosphaturiant de la PTH 1-84 ;
- la PTH 7-84 représente en moyenne 44 % de la PTH immunoréactive dans des lysats de glandes parathyroïdes provenant de patients insuffisants rénaux chroniques (IRC) parathyroïdectomisés ;
- chez des IRC dialysés, il existe une corrélation positive entre la calcémie et le pourcentage de PTH 7-84.

Ces résultats suggéraient donc que la PTH 7-84, au lieu d'être un simple produit de la PTH 1-84, était en fait un antagoniste de la PTH, possiblement sécrété par les parathyroïdes en réponse à une élévation de la calcémie et qui donc pourrait contribuer à la résistance à la PTH observée chez les patients IRC. Ces effets ont été vérifiés *in vitro* et sur des animaux de laboratoire dans de nombreux travaux. Il y a maintenant des donnés convaincantes qui documentent que ces effets inhibiteurs de la PTH 7-84 sont médiés par un récepteur différent du récepteur de la PTH/PTHrP (PTHR1). Par ailleurs, d'autres études expérimentales ont montré que la PTH 7-84 synthétique induit une internalisation sans activation de PTHR1 dans certaines cellules rénales comme celles du tubule distal mais pas dans d'autres, comme celles du tubule proximal, en fonction de la présence ou non dans ces cellules de protéines comme NHERF1. Ces résultats favorisent l'hypothèse que si cette résistance sélective à la PTH existe réellement en physiologie humaine, il pourrait s'agir d'un phénomène adaptatif visant, dans l'insuffisance rénale, à limiter l'hypercalcémie (résistance à la PTH dans le tubule distal) et l'hyperphosphatémie (pas de résistance dans le tubule proximal). Enfin, il a récemment été mis en évidence dans le sérum de patients présentant une hyperparathyroïdie primitive (HPP) ou une IRC une forme de PTH jusque-là inconnue, qui a été appelée « amino-PTH » (N-PTH) et qui pourrait être une PTH 1-84 phosphorylée sur la sérine 17. Alors que la N-PTH semble représenter moins de 10 % de l'immunoréactivité de la PTH chez les sujets normaux, des productions très excessives de cette molécule ont été rapportées chez des patients avec un carcinome parathyroïdien, chez un sujet présentant une hyperparathyroïdie primitive (HPP) très sévère pour laquelle le diagnostic de carcinome parathyroïdien ne pouvait être exclu, et chez 5 % des patients d'une série de HPP opérés consécutivement dans un même centre. Chez ces personnes, la concentration de PTH mesurée avec une technique de troisième génération été franchement plus élevée que celle mesurée avec un dosage de deuxième génération, ce profil biologique atypique se normalisant (deuxième génération plus élevée que la troisième) après parathyroïdectomie.

En résumé, on peut considérer aujourd'hui que les techniques de dosage de troisième génération mesurent la somme de la PTH 1-84 et de la N-PTH alors que les

dosages de deuxième génération (dits « de PTH intacte » !) mesurent la somme de la PTH 1-84 et de la PTH 7-84 lorsqu'ils utilisent un anticorps proximal (épitope dans la région 12-20), ou la somme de la PTH 1-84, de la PTH 7-84 et de la N-PTH lorsqu'ils utilisent un anticorps distal (épitope dans la région 25-30). Bien qu'ayant un intérêt potentiel majeur pour la compréhension de la physiologie de la PTH, les techniques de troisième génération n'ont toutefois pas démontré aujourd'hui une supériorité évidente pour la pratique journalière en termes de sensibilité diagnostique comparés aux dosages de deuxième génération. C'est vrai à la fois chez les IRC et dans le cadre du diagnostic de l'HPP. il n'y a donc pas d'argument clinique fort pour recommander d'abandonner les anciennes techniques pour les nouvelles. Cette décision nécessite en particulier d'autres études chez des IRC ayant eu une biopsie osseuse. Les autres avantages potentiels pour la pratique clinique de ces techniques de troisième génération sont :

- la possibilité de standardiser les valeurs produites par différentes techniques. Ce point est très important, en particulier pour les néphrologues qui se réfèrent, pour leurs patients dialysés, à la recommandation de maintenir la PTH entre 150 et 300 pg/ml, et ce quelle que soit la technique de dosage utilisée, alors que les diverses techniques donnent parfois des valeurs très différentes (bien que très corrélées) ;
- une amélioration de la mesure peropératoire de la PTH, souvent utilisée par les chirurgiens comme indice de succès de la parathyroïdectomie. Il y a en effet de forts arguments pour une décroissance plus rapide de la PTH 1-84 que de la PTH 7-84 dans les minutes qui suivent l'exérèse ;
- l'identification des patients HPP présentant une dose excessive de N-PTH en mesurant chez tous les HPP la PTH à la fois par une technique de deuxième et une technique de troisième génération. Cette application nécessite cependant une identification préalable de la nature exacte et de la signification physiopathologique de la N-PTH.

Enfin, dans des cas très particuliers, il est possible d'estimer l'action de la PTH sur le rein par la mesure de l'AMP cyclique urinaire, ou mieux, de l'AMP cyclique néphrogénique.

## 2. Métabolites de la vitamine D

### a) Production et métabolisme

Le terme de « vitamine D » est en fait inapproprié car il implique que cette molécule provient de l'alimentation. Si, il est vrai, l'alimentation apporte une certaine quantité de vitamine D3 (cholécalciférol) présente dans les huiles de poissons gras; la vitamine D est pour l'essentiel synthétisée dans la peau sous l'action des rayonnements ultraviolets sur le 7-déhydrocholestérol, ce qui entraîne la production de vitamine D3. Les formes médicamenteuses de vitamine D peuvent être la vitamine D3 ou la vitamine D2 (ergocalciférol).

Les deux formes de vitamine D (D2 et D3) ont des métabolismes et des modes d'action tout à fait semblables. Elles sont liposolubles et peuvent être stockées en grande quantité dans le tissu adipeux. Elles n'ont pas d'activité biologique tant qu'elles n'ont pas été hydroxylées. Une hydroxylation en position 25 se produit

dans le foie et conduit à la production de 25 OHD ou de calcidiol, qui est le principal métabolite circulant. Le calcidiol représente le stock en vitamine D et peut également être considéré comme une prohormone pour le calcitriol. La dépendance solaire du stock en vitamine D est bien illustrée par la variation circannuelle des concentrations en calcidiol, avec un minimum en hiver-printemps et un maximum en été-automne.

Les métabolites de la vitamine D circulent dans le sang liés à une α-globuline, la *vitamin D-binding protein* (DBP) et à un degré moindre à l'albumine. La DBP a une affinité plus faible pour la vitamine D2 que pour la vitamine D3, ce qui souligne la plus faible efficacité des traitements par vitamine D2 lorsqu'ils sont administrés en une dose dite « charge ». La majorité du 25 OHD circulant est métabolisée dans le foie en composés inactifs qui sont éliminés par la bile. Une petite proportion va toutefois subir une nouvelle hydroxylation dans les cellules du tubule proximal pour produire du $1,25(OH)_2D$ ou du $24,25(OH)_2D$.

Le $1,25\ (OH)_2D$ ou calcitriol est considéré comme le métabolite actif principal de la vitamine D et circule en faibles concentrations : de l'ordre de quelques dizaines de pg/ml contre quelques centaines de pg/ml pour le $24,25\ (OH)_2D$, semble-t-il inactif, et quelques dizaines de ng/ml pour le 25 OHD. Contrairement à l'hydroxylation hépatique en 25, la 1α-hydroxylation rénale sous l'action de la 1α-hydroxylase est étroitement régulée. Elle est en particulier stimulée par une hypophosphorémie et par de fortes concentrations de PTH. Dans les situations inverses, cette hydroxylation est inhibée et il existe une plus importante production de $24,25\ (OH)_2D$. D'autres facteurs peuvent également stimuler la 1α-hydroxylase, comme l'hormone de croissance (par l'intermédiaire de l'IGF-1), les œstrogènes et un régime pauvre en calcium.

Bien que le rein soit la principale source de production de calcitriol, il peut y avoir production extrarénale. Pendant la grossesse, le placenta synthétise du $1,25\ (OH)_2D$ et dans certaines pathologies granulomateuses (sarcoïdose, tuberculose, etc.) les macrophages du granulome peuvent également hydroxyler le calcidiol en position 1. Dans ce dernier cas, la synthèse n'est pas régulée et est dépendante de la quantité de substrat, c'est-à-dire qu'elle sera d'autant plus importante que le stock vitaminique D sera important. Les conséquences biologiques seront une hypercalciurie avec PTH basse associée dans les cas les plus sévères à une hypercalcémie-hyperphosphatémie.

### b) Effets cellulaires

Les métabolites de la vitamine D agissent par l'intermédiaire d'un récepteur cytosolique (ou VDR), semblable aux récepteurs des stéroïdes et des hormones thyroïdiennes. Le calcitriol a approximativement mille fois plus d'affinité pour le VDR que le calcidiol, qui a lui-même environ dix fois plus d'affinité que le $24,25\ (OH)_2D$. Toutefois, la concentration circulante de calcidiol étant environ mille fois plus importante que celle de calcitriol, il est possible que ce métabolite ait une certaine activité biologique.

Le principal site d'action du calcitriol est l'intestin où il stimule la synthèse de protéine fixant le calcium (*calcium-binding protein*) qui va favoriser l'absorption du calcium mais également celle du phosphore. Au plan osseux, le calcitriol semble agir au niveau de l'ostéoblaste pour stimuler la production de facteurs locaux

impliqués dans la maturation ostéoclastique. En fait, il potentialise l'action de la PTH sur la résorption osseuse mais joue *a contrario* un rôle essentiel dans la minéralisation par son action sur le couple calcium-phosphore et par ses effets positifs sur la différenciation et l'activité des ostéoblastes. Le calcitriol va également stimuler l'expression du gène de l'ostéocalcine. Le calcitriol exerce un rétrocontrôle sur la synthèse de prépro-PTH, limitant ainsi l'hyperplasie parathyroïdienne en cas d'hypersécrétion de PTH. Le calcitriol exerce enfin des effets directs sur le foie et le rein, influençant ainsi négativement l'hydroxylation du calcidiol. Il existe des récepteurs sur bien d'autres cellules, avec un rôle du calcitriol sur la régulation de certaines fonctions immunitaires, sur la différenciation cellulaire et sur la production de cytokines. Ces cellules sont par ailleurs équipées de la 1a-hydroxylase et fabriquent leur propre calcitriol qu'elles utilisent de manière auto- et paracrine.

#### c) Dosages des métabolites de la vitamine D

Le dosage du calcidiol représente le stock en vitamine D de l'organisme. Le calcitriol est, quant à lui, très étroitement régulé, et sa concentration n'est donc pas liée à celle du calcidiol (sauf en cas de déficit complet). Du fait de la liaison aux protéines, le dosage proprement dit des métabolites de la vitamine D doit absolument être précédé d'une étape d'extraction-purification qui élimine les substances interférentes et les lipides. Rappelons à cet égard que le calcitriol ne diffère du calcidiol que par la présence d'un seul résidu OH et qu'il circule en général à des concentrations mille fois plus faibles.
Comme pour n'importe quel paramètre, il faut interpréter un résultat de 25 OHD par rapport à des « valeurs normales » et en tenant compte des apports exogènes de vitamine D. Ainsi, si l'on considère qu'un taux circulant de 25 OHD inférieur ou égal à 30 ng/ml peut induire une hyperparathyroïdie secondaire, les quatre cinquièmes environ de la population d'Île-de-France peuvent être considérés comme carencés en vitamine-D en hiver. Avec un dosage de référence, les valeurs de 25 OHD mesurées dans un échantillon de population « normale » vont varier de 5 à 30 ng/ml et nous préférons donc substituer le terme de « valeurs souhaitables » (30 à 60 ng/ml avec le dosage évoqué) à celui de « valeurs normales ». D'autre part, ce qui s'applique à la PTH est vrai pour le calcitriol, à savoir qu'une valeur de 1,25 (OH)2D ne doit pas être interprétée isolément mais doit être considérée dans le cadre d'un bilan phosphocalcique complet en tenant compte en particulier de la phosphatémie.
Actuellement, le dosage de la 1,25-dihydroxy-vitamine D reste délicat et réservé à des laboratoires spécialisés. Le développement de techniques simples et non radio-isotopiques pour la 25 OHD a grandement modifié l'accès à ce dosage.

### 3. Calcitonine

Il s'agit d'un peptide de 32 acides aminés, synthétisé par les cellules C de la thyroïde. La calcitonine est métabolisée dans le rein et sa demi-vie est courte, de l'ordre de 5 minutes Sa sécrétion est stimulée par une hypercalcémie, mais également par un certain nombre d'hormones digestives comme la gastrine. Elle diminue la calcémie grâce à une action directe sur l'ostéoclaste qui possède un récepteur de surface à la calcitonine, couplé à une protéine G. Elle semble également

agir sur le rein en diminuant la réabsorption tubulaire du calcium et des phosphates. Malgré ces actions clairement documentées, la signification physiologique de la concentration circulante de calcitonine n'est pas claire, d'autant que les situations cliniques associées à une hypersécrétion de calcitonine (cancer médullaire de la thyroïde) ne s'accompagnent pas d'une hypocalcémie. Les dosages modernes de calcitonine sont considérés comme un outil important dans l'évaluation des cancers médullaires de la thyroïde (marqueur tumoral). Ils semblent en revanche de très peu d'intérêt dans l'exploration du métabolisme phosphocalcique.

#### 4. Parathormone related peptide (PTHrP)

Il existe dans le sérum, sous trois isoformes de 139, 141 et 173 acides aminés. Huit des treize premiers acides aminés sont semblables à ceux que l'on observe dans la partie N-terminale de la PTH et cette région interagit avec le récepteur de la PTH. Les autres régions du PTHrP n'ont aucune homologie avec la PTH. Il existe différents immunodosages du PTHrP, les plus fiables semblant être des dosages sandwich spécifiques de la région 1-86.

## II. Stratégie de l'exploration phosphocalcique

Il ne s'agit pas de reprendre ici en détail l'exploration du métabolisme phosphocalcique, mais d'insister sur quelques points d'importance. Tout d'abord, tous les examens composant ce bilan doivent impérativement être effectués à partir d'un même prélèvement. Si, par exemple, une hyper- ou une hypocalcémie a été déjà mise en évidence chez un patient, il faudra malgré tout de nouveau effectuer le dosage de la calcémie afin de la confronter aux autres paramètres phosphocalciques.
Il faut insister sur le fait que les conditions de prélèvement et d'acheminement-conservation des échantillons sont fondamentales. De même, il est important de disposer d'un maximum de renseignements sur les antécédents médicaux, le mode de vie (alcool, tabac, exercice, etc.), la prise de médicaments (calcium, vitamine D, traitement hormonal substitutif, bisphosphonates, corticoïdes, diurétiques thiazidiques, etc.) et le régime calcique (enquête alimentaire). La démarche à instaurer pour l'interprétation du bilan phosphocalcique s'appuie sur des paramètres bien précis développés ci-dessous.

### A. En présence d'une anomalie des paramètres biochimiques de base

La démarche d'interprétation du bilan est schématisée sur les *figures 1, 2, 3* et *4*.

#### 1. Hypercalcémie

Lors d'une hypercalcémie, le dosage de la PTH permet l'orientation vers une origine parathyroïdienne ou non parathyroïdienne (*fig. 1*). Rappelons une nouvelle fois qu'un résultat de PTH est ininterprétable sans la calcémie concomitante. Il

existe en effet des hyperparathyroïdies primitives authentifiées et opérées qui se présentent avec une hypercalcémie modérée (voire uniquement avec une hypercalcémie ionisée) associée à une PTH normale haute. L'absence de freination de la PTH en hypercalcémie témoigne d'un dysfonctionnement parathyroïdien. Mais avant de conclure alors à une hyperparathyroïdie primitive, il faudra d'abord considérer la calciurie. Même si, lors d'une hyperparathyroïdie primaire, l'hypercalciurie est moins importante que ne le laisserait supposer l'hypercalcémie (en raison de l'augmentation de la réabsorption tubulaire du calcium due à la PTH), l'hypocalciurie doit être inexistante (la définition d'une hypocalciurie est toutefois très floue). La présence d'une hypocalciurie doit faire discuter le diagnostic d'hypercalcémie-hypocalciurie familiale, ou syndrome de Marx, dû à une mutation inactivante sur le gène du récepteur sensible au calcium. La détection de la mutation par des techniques de biologie moléculaire permettra d'établir le diagnostic (ce n'est toutefois pas encore un examen de « routine »). Dans ce cas, si le rapport clairance du calcium, clairance de la créatinine [= Cau × Crs/Cas × Cru] ou excrétion fractionnelle du calcium est inférieur à 0,01, le diagnostic peut alors pencher en faveur du syndrome de Marx. Ce diagnostic est important car la parathyroïdectomie, traitement de l'hyperparathyroïdie primaire, est inefficace en cas de syndrome de Marx.

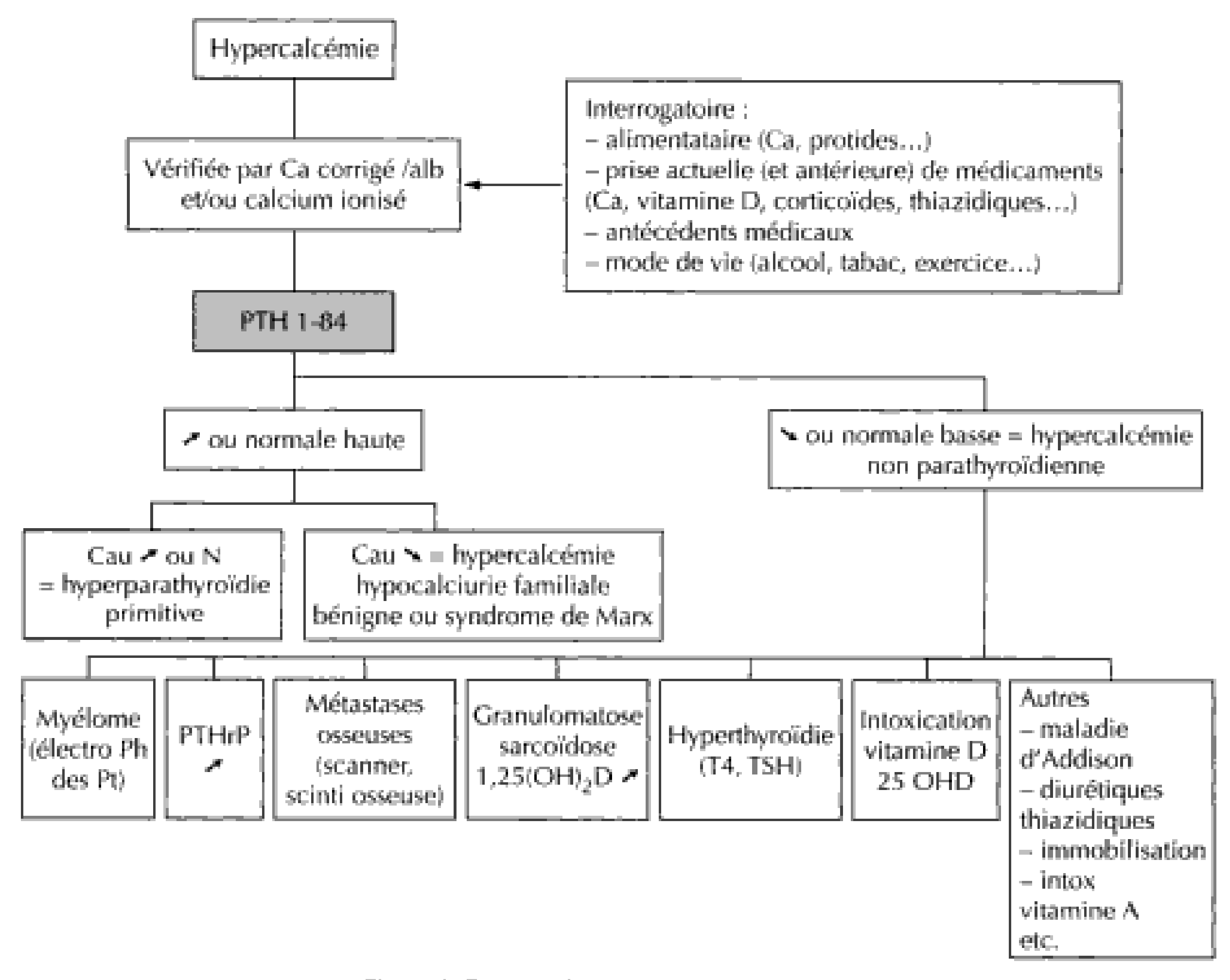
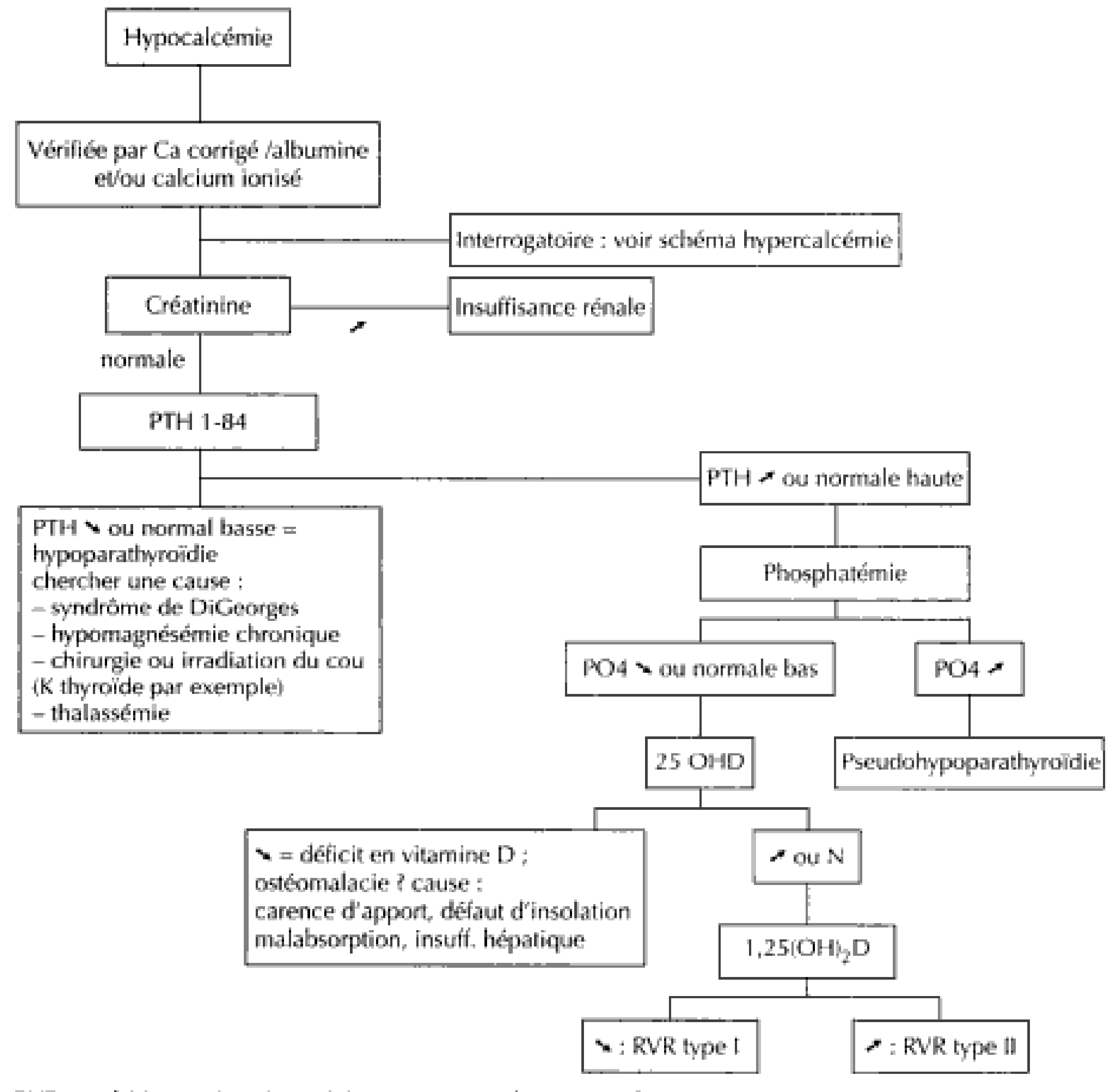



**Figure 1.** Exploration d'une hypercalcémie

La constatation d'une PTH freinée doit faire conclure à une origine extraparathyroïdienne de l'hypercalcémie (PTHrP, métastases osseuses, myélome, hyperthyroïdie, sarcoïdose ou lymphome avec élévation du calcitriol circulant, intoxication par la vitamine D, grand excès d'apports calciques alimentaires, traitement par thiazidiques, etc.) que l'on documentera par les examens appropriés.

## 2. Hypocalcémie

En cas d'hypocalcémie (après vérification de sa réalité par la calcémie corrigée ou la calcémie ionisée et après élimination d'une insuffisance rénale), on différenciera une hypoparathyroïdie d'une autre cause par le dosage de la PTH (PTH basse ou normale basse dans l'hypoparathyroïdie). Si la PTH est augmentée (ou normale haute), c'est la phosphatémie qui donnera l'orientation diagnostique, une hypophosphatémie suggérant une anomalie du métabolisme de la vitamine D, une hyperphosphatémie orientant vers une pseudo-hypoparathyroïdie (*fig. 2*).




RVR : rachitisme vitamino-résistant ou pseudo-carentiel.

**Figure 2.** Exploration d'une hypocalcémie

## 3. Hypophosphatémie

En cas d'hypophosphatémie (PO4 < 0,8 mM), il est nécessaire de s'intéresser tout d'abord au taux de réabsorption du phosphate rapporté au débit de filtration glomérulaire (TmPO4/DFG). En cas de diminution du TmPO4/DFG (fuite tubulaire de phosphate ou diabète phosphaté), et si la calcémie et la calciurie sont normales, il faudra être attentif à la concentration circulante de calcitriol qui doit être augmentée. Si elle est basse (ou normale), il faut évoquer une anomalie de la 1α-hydroxylation rénale et rechercher une cause à cette fuite tubulaire de phosphates (tumeur mésenchymateuse difficile à mettre en évidence) (*fig. 3*). On pourra rechercher la présence d'une phosphatonine (protéine induisant une fuite rénale de phosphate). La mieux connue est la FGF23, aujourd'hui facilement dosable dans le plasma.

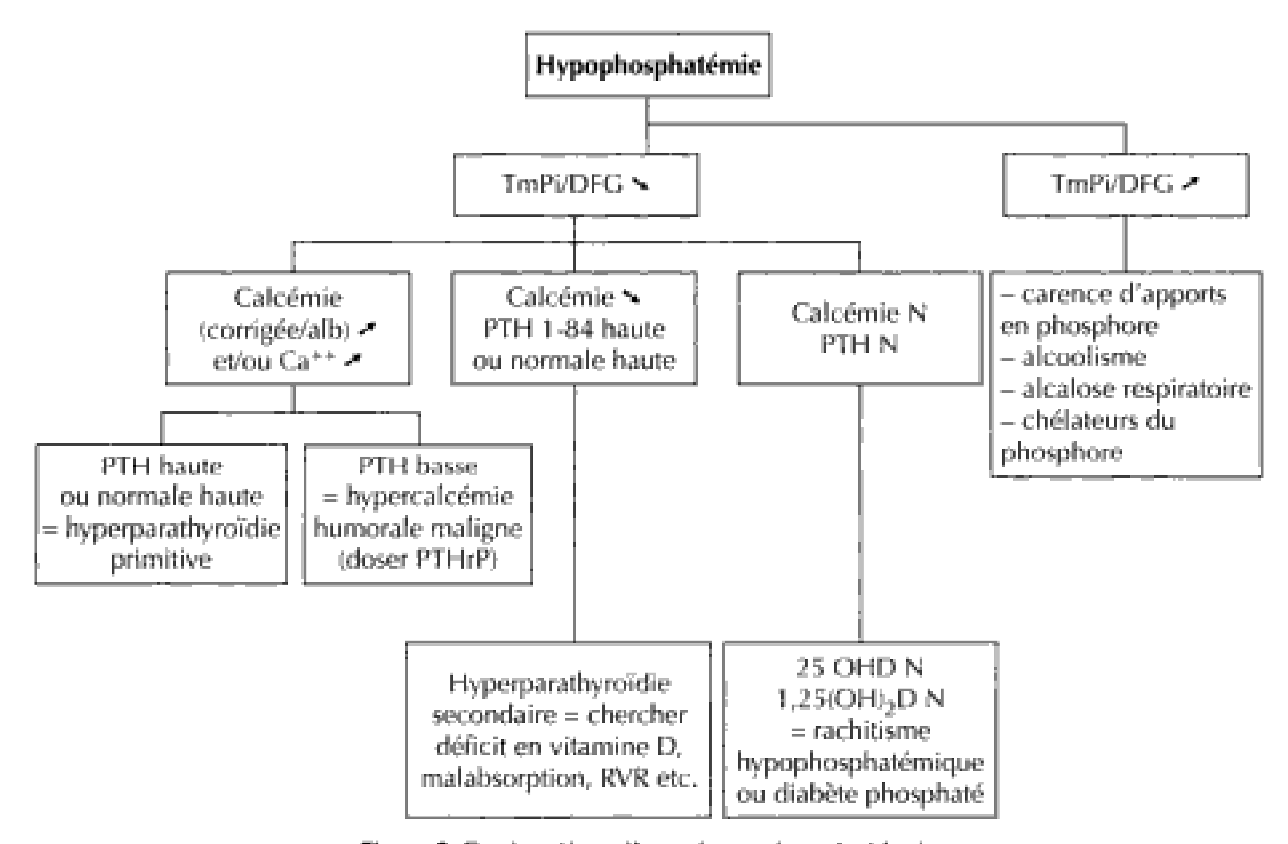



**Figure 3.** Exploration d'une hypophosphatémie

## 4. Hyperphosphatémie

En cas d'hyperphosphatémie (PO4 > 1,50 mM), il faut tout d'abord éliminer une insuffisance rénale puis s'orienter en fonction des résultats de la calcémie (*fig. 4*).

# B. En l'absence d'anomalie de la calcémie et de la phosphatémie de base

Dans certaines situations cliniques, comme des ostéoporoses importantes sans facteurs de risque majeurs, il est très courant de trouver une anomalie biologique « phosphocalcique », malgré une calcémie et une phosphatémie normales. Les anomalies les plus courantes sont, d'une part, des déficits vitaminiques D et, d'autre part, des hypercalciuries d'étiologies variées.

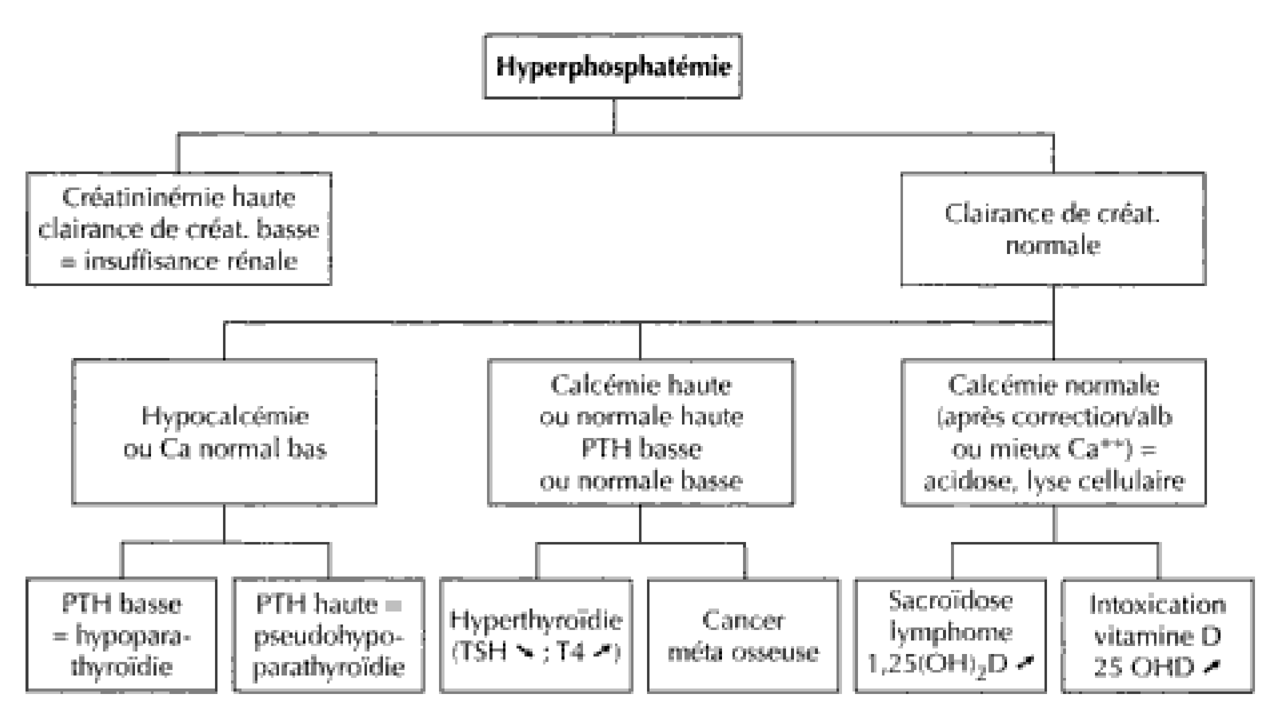


**Figure 4.** Exploration d'une hyperphosphatémie

Le *déficit en vitamine D* est apprécié au mieux par la mesure du 25OHD. On distinguera les carences profondes < 10 ng/ml en général) des simples insuffisances retrouvées chez environ 80 % de la population française en hiver et au printemps (de 11 à 30 ng/ml en pratique). Ces deux situations sont responsables, à des degrés divers, d'une hyperparathyroïdie secondaire pouvant aggraver une situation d'ostéopénie, en particulier touchant l'os cortical. Elles sont facilement traitables par des doses physiologiques de vitamine D (800 unités de vitamine D par jour), après avoir administré une dose plus importante en cas de carence profonde (une ampoule contenant 100 000 unités de vitamine D tous les quinze jours pendant deux mois), et sont donc intéressantes à détecter.

En présence d'une hypercalciurie sans hypercalcémie, une intoxication vitaminique D peut être éliminée par le dosage du 25 OHD, si le dosage utilisé reconnaît les formes D2 et D3. Il s'agit ensuite de différencier l'origine osseuse, alimentaire, rénale ou absorptive de cette hypercalciurie.

On utilise à cet effet le test de charge calcique, pratiqué en fonction de la capacité d'absorption intestinale du calcium. Il s'agit d'administrer 1 g de calcium par prise orale, après trois jours de régime pauvre en calcium (300 mg/j), avec mesure de la calcémie et de la calciurie avant la prise, puis deux heures et quatre heures après. Une augmentation trop importante de la calciurie alors que la calciurie de base est normale est en faveur d'une hypercalciurie dite « absorptive ». La persistance d'une hypercalciurie de base sans hypernatriurie malgré un régime pauvre en calcium bien respecté est en faveur d'une hypercalciurie rénale traitable par les diurétiques thiazidiques. Chez certains patients dont le bilan phosphocalcique suggère une hyperparathyroïdie primaire atypique (avec, par exemple, une calcémie et une PTH à la limite supérieure des valeurs normales), il est plus intéressant de mesurer la PTH pendant le test de charge calcique : une diminution faible de la PTH sera en faveur d'une hyperparathyroïdie primitive (à condition que l'on ait pu observer une augmentation de la calcémie), surtout si les coupes Ca-PTH sont inadaptées.

# III. Marqueurs osseux

Le tissu osseux est constitué d'une matrice inorganique (cristaux d'hydroxyapatite) et d'une matrice organique composée surtout de collagène de type 1 et de protéines non collagéniques. Le tout est en perpétuel renouvellement sous l'action de deux types de cellules, les ostéoclastes (responsables de la destruction osseuse ou résorption) et les ostéoblastes (responsables de la formation osseuse). Ce phénomène est appelé remodelage (ou « *turn-over* ») osseux. La perte osseuse associée à la ménopause, au vieillissement ou à certaines pathologies, est obligatoirement due à une balance négative entre l'activité ostéoclastique et l'activité ostéoblastique. Toutefois, en de très nombreuses circonstances, et particulièrement dans l'ostéoporose primitive (par opposition à l'ostéoporose secondaire qui est la conséquence d'une pathologie), les perturbations du remodelage osseux sont modérées et les modifications des paramètres classiques du métabolisme phosphocalcique sont trop faibles pour être utiles en pratique courante. La méthode de référence pour étudier le remodelage osseux (cinétique des radiotraceurs) est lourde et invasive. L'histomorphométrie sur biopsie osseuse après double marquage à la tétracycline apporte également des informations précieuses sur le métabolisme osseux dans une zone localisée (crête iliaque). Il s'agit aussi d'un examen invasif qui ne peut être proposé facilement.
C'est ainsi qu'a été développée la mesure des marqueurs osseux, technique plus simple, non invasive et spécifique. Il peut s'agir soit de la mesure d'une activité enzymatique plus ou moins spécifique des ostéoblastes ou des ostéoclastes, soit de la mesure d'un constituant de la matrice relargué dans la circulation lors de la formation ou de la dégradation osseuse. La mise au point du dosage de certains de ces paramètres biologiques a permis, en association avec l'évaluation densitométrique de la masse osseuse, de caractériser plus précisément certaines pathologies métaboliques. Ces différents marqueurs osseux (*tab. 2*) ont des spécificités et des sensibilités variables selon les situations étudiées. Ils ont chacun des avantages et des inconvénients, et certains sont encore en cours d'évaluation.

**Tableau 2.** Principaux marqueurs du remodelage osseux

| Formation osseuse | | Résorption osseuse |
|---|---|---|
| Ostéocalcine (Oc)<br>Phosphatase alcaline totale (TAP)<br>Phosphatase alcaline osseuse (bAP) | *Non collagéniques*<br>Sérum | Phosphatase acide tartrate résistante (TRAP) |
| Propeptide C-terminal du procollagène de type 1 (P1CP)<br>Propeptide N-terminal du procollagène de type 1 (P1NP) | *Collagéniques*<br>Sérum | Télopeptide N-terminal (NTx)<br>Télopeptide C-terminal (CTx) |
| | Urine | Désoxypyridinoline totale (tDpd)<br>Désoxypyridinoline libre (fDpd)<br>Pyridinoline libre (fPyd)<br>Télopeptide N-terminal (NTx)<br>Télopeptide C-terminal isomérisé (βCTx) ou non isomérisé (αCTx) |

## A. Marqueurs osseux non liés au métabolisme du collagène de type 1

### 1. Marqueurs de formation osseuse

#### a) Phosphatases alcalines sériques

Les phosphatases alcalines humaines sont des glycoprotéines produites par différents tissus (foie, rein, os, intestin, placenta), mais sous forme de variétés isozymiques différentes. Les isoenzymes hépatique, osseuse et rénale sont des produits d'un même gène et diffèrent entre elles principalement par leur degré de glycosylation et le nombre de résidus d'acide sialique.
L'activité phosphatase alcaline est depuis longtemps considérée et utilisée comme un marqueur du remodelage osseux. Toutefois, une augmentation des phosphatases alcalines totales peut également être le reflet d'une pathologie hépatique ou d'une prise médicamenteuse. Il s'agit donc d'un marqueur peu sensible et peu spécifique du métabolisme osseux. Par ailleurs, l'augmentation des phosphatases alcalines totales ne reflète pas seulement l'augmentation de la formation osseuse, elle peut aussi être le témoin d'un trouble de la minéralisation de l'ostéoïde, lors d'une ostéomalacie par exemple. Il existe depuis peu des dosages permettant de quantifier l'activité ou la masse de l'isoenzyme osseuse des phosphatases alcalines. Ces dosages sont donc beaucoup plus sensibles, pour détecter des modifications du remodelage osseux que la mesure de l'activité phosphatase alcaline totale. Il ne faut cependant pas négliger une éventuelle réaction croisée avec l'isoenzyme hépatique (de l'ordre de 15 %) pouvant induire, en cas de pathologie hépatique sévère, des valeurs faussement élevées. Enfin, l'isoenzyme osseuse n'étant pas éliminée par le rein, elle pourrait ainsi être également un bon marqueur du remodelage osseux chez les patients atteints d'une insuffisance rénale.

#### b) Ostéocalcine

L'ostéocalcine (Oc), encore appelée « GLA protéine » ou « BGP » (*bone GLA protein*), de masse moléculaire 5 800 Da, est un peptide monocaténaire de 49 acides aminés comportant trois résidus d'acide γ-carboxyglutamique (GLA) en positions 17, 21 et 24. Ces résidus GLA confèrent à la molécule d'Oc une très forte affinité pour le calcium. La synthèse de l'Oc est assurée essentiellement par les ostéoblastes sous la dépendance du calcitriol et de la vitamine K nécessaire à la carboxylation des acides glutamiques (GLU) en GLA. L'Oc native est sécrétée dans le milieu extracellulaire où elle se fixe aux cristaux d'hydroxyapatite présents au sein de la matrice osseuse, à la différence de sa forme décarboxylée, sécrétée lors de déplétion vitaminique K qui, elle, ne se fixe pas sur la matrice osseuse.
Une petite fraction de l'Oc nouvellement synthétisée (10 à 40 %) passe dans la circulation sanguine où elle pourra être mesurée par des techniques d'immunoanalyse. L'Oc (ou tout du moins ses formes moléculaires les plus grosses) n'étant pas relarguée lors de la résorption osseuse, sa concentration sanguine reflétera plus particulièrement l'activité de formation osseuse.

La demi-vie de l'Oc est brève, de l'ordre de 5 minutes. Son rôle précis au niveau de l'os est encore mal connu. Il existe de nombreux dosages d'Oc pour lesquels il faut connaître un certain nombre de pièges analytiques :

- certains anticorps sont dits « calcium dépendants » et ne reconnaissent pas l'Oc lorsqu'elle est dans un milieu pauvre en calcium. Il faut dans ce cas proscrire tout prélèvement effectué sur EDTA ;
- lorsque les sérums ne sont pas congelés rapidement (dans l'heure qui suit le prélèvement), une dégradation de la molécule d'Oc intacte (1-49) avec une accumulation de fragments de clivage et en particulier d'un fragment 1-43 se produit. Pour éviter ce piège, il est conseillé d'utiliser un dosage d'Oc qui reconnaît la molécule intacte et le fragment 1-43 de la même manière. Ainsi, une molécule ayant subi la protéolyse sera tout de même reconnue par l'anticorps. Pour information, en utilisant un dosage spécifique exclusivement de l'Oc intacte, on observe une perte d'immunoréactivité de 40 % environ sur des sérums congelés quatre heures après le prélèvement par rapport à une congélation immédiate de l'échantillon ;
- la carboxylation de l'Oc (transformation des GLU en GLA) dépend du statut vitaminique K du sujet. Dans des situations de carence, l'Oc sera alors sécrétée majoritairement sous sa forme décarboxylée qui, ne se fixant pas au calcium osseux, sera alors relarguée en quasi-totalité dans la circulation. La concentration d'Oc mesurée dépendra de la spécificité du dosage. Ainsi, lorsque les formes carboxylée et décarboxylée de l'Oc sont reconnues de façon identique, une augmentation de l'Oc circulante pourra être interprétée comme étant le reflet d'un haut remodelage osseux, alors qu'en réalité il existe un appauvrissement de l'os en ostéocalcine carboxylée. Il a été montré que la mesure de l'ostéocalcine décarboxylée était un index très sensible du statut vitaminique K.

### 2. Marqueurs de résorption osseuse

*Phosphatases acides tartrates résistantes* (TRAP) : les ostéoclastes sécrètent des enzymes et de l'acide pendant la phase de résorption. Les phosphatases acides tartrate résistantes (TRAP) ont été identifiées à la fois dans la membrane des ostéoclastes et dans la cavité de résorption. La mesure sérique de cette enzyme pourrait donc être un indice intéressant de l'activité ostéoclastique. La difficulté de mesurer uniquement l'isoenzyme ostéoclastique ainsi que l'extrême labilité de cette molécule ont considérablement limité le développement des dosages de TRAP. Il existe depuis peu un immunodosage très prometteur.

## B. Paramètres spécifiques du métabolisme du collagène de type 1

### 1. Rappel sur le métabolisme du collagène de type 1

Le rôle d'une matrice extracellulaire est de soutenir et de relier des cellules entre elles et de donner sa structure à un tissu. Chez l'homme, les deux constituants majeurs des matrices extracellulaires sont, d'une part, de grosses protéines fibrillaires, les collagènes, et, d'autre part, des agrégats de protéines et de sucres, les pro-

téoglycans. Nous avons déjà vu que le constituant principal, non minéral, de la matrice osseuse était le collagène de type 1. On donne le nom global de « collagène » à une famille de protéines ayant en commun une structure particulière, appelée « triple hélice polypeptidique », et dans laquelle on peut observer une répétition de la séquence suivante : (Gly-X-Y)n, où X et Y peuvent être n'importe quel acide aminé. Toutefois, certaines molécules de l'organisme affichent cette particularité sans présenter le critère fonctionnel de soutien des tissus commun à tous les collagènes (fraction C1q du complément, acétylcholinestérase).

Le collagène de type 1 est la plus abondante des protéines chez l'homme (2 à 3 kg). Il est fabriqué par les ostéoblastes (sous forme de chaînes de procollagène) et il est localisé à plus de 90 % dans le tissu osseux sous forme de deux chaînes peptidiques identiques ($\alpha 1$) et d'une chaîne différente mais homologue ($\alpha 2$). Les différentes chaînes procollagéniques sont transportées dans le réticulum endoplasmique où elles subissent des transformations sous l'influence d'enzymes spécifiques. Au moins 20 % des acides aminés présents dans le peptide initial sont transformés par des processus enzymatiques dont le principal est l'hydroxylation de la proline en hydroxyproline, sans laquelle le collagène ne peut apparaître sous la forme d'une triple hélice. Un autre phénomène important est l'hydroxylation de certains résidus lysine en hydroxylysine, hydroxylation nécessaire à la formation de ponts entre différentes molécules de collagène.

Lorsque la structure en triple hélice est obtenue, la molécule de procollagène 1 est excrétée dans le liquide extracellulaire où elle est rapidement clivée, d'abord à l'extrémité N-terminale, puis à l'extrémité C-terminale par des enzymes spécifiques. Les peptides d'extension C-terminal et N-terminal sont relargués dans la circulation dans un rapport stœchiométrique. Une portion du peptide N-terminal est toutefois probablement réincorporée dans la matrice.

Une fois libérées de leurs peptides d'extension, les molécules de collagène de type 1 s'assemblent rapidement en fibres de collagène grâce à différentes réactions chimiques. La première étape est enzymatique : la lysyl oxydase catalyse l'oxydation des groupements aminés des résidus lysine ou hydroxylysine pour former les aldéhydes correspondants. Les aldéhydes ainsi formés peuvent interagir pour former des ponts, encore appelés « *cross-links* », entre deux molécules de collagène. Dans l'os, les plus connus parmi ces agents de pontage sont la pyridinoline et la désoxypyridinoline qui sont caractérisées par une structure cyclique et la propriété d'émettre une fluorescence caractéristique. Dans le collagène 1, ces *cross-links* sont formés à des endroits préférentiels : le site principal est la petite partie non hélicoïdale située aux deux extrémités d'une molécule de collagène, appelée « télopeptide ». Ces télopeptides sont ainsi connectés à certaines régions de la partie hélicoïdale d'une molécule de collagène 1 voisine pour former les fibres de collagène.

Lors de la résorption osseuse, le collagène 1 est dégradé. La quantité annuelle de collagène dégradé est considérable chez tous les individus mais particulièrement chez les enfants. La dégradation enzymatique et chimique du collagène entraîne la libération dans la circulation de petits peptides et d'acides aminés libres qui sont partiellement éliminés dans les urines (la synthèse et la dégradation du collagène de type 1 sont illustrées *fig. 5*).

## 2. Marqueurs de formation osseuse

### a) P1CP

Il s'agit de la mesure du peptide d'extension C-terminal du procollagène de type 1 (P1CP). C'est une protéine globulaire (PM = 100 kDa environ), trimérique, stabilisée par des ponts disulfures. Comme les molécules de collagène de type 1 et de P1CP sont formées dans un rapport 1/1, le dosage de P1CP permet donc en théorie d'évaluer la formation du collagène de type 1 (de la même façon qu'il est possible d'évaluer la sécrétion d'insuline grâce au dosage du peptide C). Les résultats obtenus dans l'ostéoporose sont toutefois très décevants.

### b) P1NP

Des dosages récents du propeptide N-terminal du procollagène 1 ont été développés. Certains sont disponibles sur automate d'immunoanalyse. Les résultats récents suggèrent que ce marqueur pourrait être le témoin le plus sensible de la synthèse de collagène 1 et de la formation osseuse.

## 3. Marqueurs de résorption osseuse

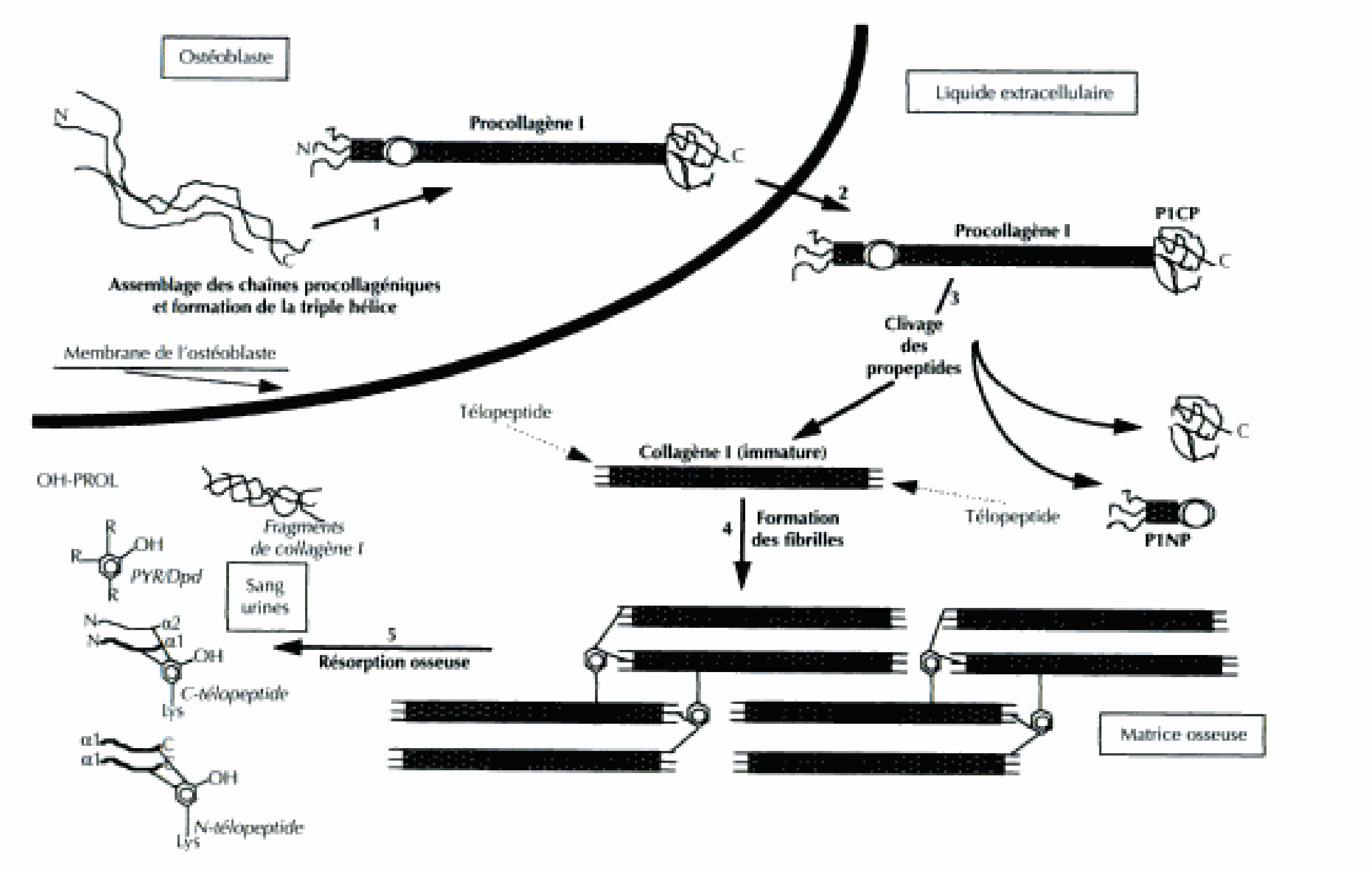
### a) Hydroxyproline

Cet acide aminé, composant majeur des collagènes, est relargué lors de la résorption et n'est pas réutilisé pour la synthèse de nouvelles molécules de collagène. Son dosage urinaire a traditionnellement été utilisé comme le reflet de la dégradation de la matrice osseuse. En pratique, c'est un marqueur peu spécifique car son excrétion provient de plusieurs sources : le collagène (osseux et non osseux), des protéines non collagéniques (fraction C1q du complément, élastine), mais aussi certains apports alimentaires (viandes, gélatine). L'hydroxyprolinurie est donc mal corrélée avec les paramètres de résorption évalués par une biopsie osseuse. Elle est cependant augmentée lors des périodes physiologiques de haut remodelage osseux (croissance, postménopause). On peut considérer aujourd'hui que ce marqueur est obsolète pour l'exploration des ostéoporoses.

### b) Pyridinolines : totales, libres et associées à des fragments de télopeptides

La pyridinoline (PYR) et la désoxypyridinoline (Dpd) sont des molécules de pontage ou *cross-links*, qui vont stabiliser les fibres de collagène au sein de la matrice extracellulaire. L'U-PYR prédomine dans tous les tissus. Cependant, le rapport PYR-Dpd est moins élevé dans l'os que dans les autres tissus (PYR-Dpd = 3,5 dans l'os et 10 à 50 dans les autres tissus). La Dpd est donc plus spécifique de l'os que la PYR.

Lors de la résorption osseuse, le collagène est dégradé : la PYR et la Dpd sont relarguées dans la circulation sous forme libre et sous forme conjuguée à des peptides. Une partie de la fraction libre retrouvée dans les urines provient d'un catabolisme rénal. Même si elles sont présentes dans l'alimentation, la PYR et la Dpd ne seraient pas absorbées et il n'y aurait aucune contribution alimentaire dans l'excrétion urinaire de la Dpd, même après une ingestion de gélatine. Il a été également démontré que, lorsque le niveau de résorption osseuse augmente, le pourcentage de formes libres retrouvées dans l'urine diminue (même si, en valeur absolue, la concentration des formes libres augmente).




Les peptides collagéniques sont synthétisés sous la forme de prépro-α-chaînes qui perdent leur prépeptide dans le réticulum endoplasmique de l'ostéoblaste puis (1) s'assemblent en structure « triple hélicoïdale » après hydroxylation de résidus proline et lysine pour former une molécule de procollagène de type 1. Le procollagène est transporté dans l'appareil de Golgi et sécrété par l'ostéoblaste (2). Les propeptides C- et N-terminaux sont alors immédiatement clivés sous l'action d'enzymes spécifiques en libérant dans l'espace extracellulaire une molécule de collagène 1 (3). Cette molécule de collagène immature subit des transformations (4) correspondant à la formation d'agents de pontages (ou *cross-links*) entre plusieurs molécules de collagène pour aboutir à une structure fibrillaire collagénique qui se minéralisera par la suite. Ces *cross-links* sont formés à des sites particuliers, les petites extrémités non hélicoïdales des molécules de collagène appelées « télopeptides ». Lors de la résorption osseuse (5), les ostéoclastes libèrent dans la circulation des fragments de collagène, contenant ou non des *cross-links*, dont certains pourront être mesurés comme indices de la résorption osseuse.

**Figure 5.** Synthèse et dégradation du collagène de type 1

## 4. Dosages disponibles en pratique

La mesure de ces différents paramètres est faite en général sur un recueil urinaire (deuxième miction du matin le plus souvent). Les résultats sont alors exprimés en fonction de la créatininurie. Il existe cependant des dosages sériques (pour le CTx en particulier) qui permettent de s'affranchir de la mesure de la créatininurie.

### a) Pyridinolines totales urinaires

On entend par « pyridinolines totales » la somme des formes libres et des formes peptidiques, mesurées après hydrolyse acide des urines. La méthode de référence correspond à un dosage par HPLC. Les pyridinolines totales peuvent être également mesurées par immunoanalyse (à l'aide des trousses destinées à la mesure de la Dpd libre) après hydrolyse acide simplifiée des urines. Cette technique reste malgré tout un peu lourde.

### b) Dpd libre urinaire

Il existe actuellement des méthodes qui reconnaissent uniquement la Dpd libre. Ces dosages sont progressivement adaptés sur des automates d'immunoanalyse.

### c) Peptides issus des télopeptides (urines ou sérum)

Plusieurs immunodosages de peptides contenant des *cross-links* ont été développés en raison de la présence majoritaire de formes peptidiques de pyridinolines dans les urines. Ces dosages ne requièrent ni hydrolyse ni prétraitement des urines ou du sérum et sont disponibles sur des automates d'immunoanalyse :

- N-télopeptide (NTx) ;
- C-télopeptide (CTx) ou *cross-laps*.

# C. Problèmes posés par l'interprétation des marqueurs osseux

## 1. Variations physiologiques et environnementales

Les concentrations sanguines et urinaires des différents marqueurs osseux évoluent chez l'homme avec l'âge. Chez l'enfant, les variations des concentrations en fonction de l'âge sont plus ou moins parallèles à la vitesse de croissance : élevées dans la première année de vie, elles diminuent ensuite progressivement puis présentent un pic en milieu de puberté (stade de Tanner P3 pour les filles et P4 pour les garçons), pour diminuer ensuite chez l'adulte jeune. Les concentrations restent stables (un peu plus élevées en général pour la décade 21-30 ans) pour augmenter de nouveau chez la femme en période postménopausique. Cette élévation est le reflet de l'augmentation du remodelage osseux associée au déficit en œstrogènes. Plus tard, chez l'homme comme chez la femme, on observe une deuxième phase d'augmentation qui est le reflet d'une persistance du haut remodelage lié à l'hyperparathyroïdie secondaire souvent présente chez le sujet âgé. Dans ces conditions, il convient d'interpréter un résultat de marqueurs en se référant à des normes soigneusement établies en fonction de l'âge, du sexe et, pour les enfants, du stade pubertaire.

Les marqueurs osseux sont soumis à un rythme circadien avec un pic en fin de nuit et un minimum l'après-midi. Ce rythme peut être important à prendre en compte pour le moment du prélèvement. Un prélèvement entre 8 et 10 heures du matin est conseillé pour les dosages sanguins. Pour les dosages urinaires, il n'existe pas de consensus et il faut choisir entre urines de 24 heures, premières urines du matin (c'est-à-dire urines de la nuit, théoriquement plus concentrées que les autres recueils de la journée) ou deuxièmes urines du matin à jeun. Quel que soit le choix, il faudra se référer à des normes établies dans des conditions appropriées.
Le mode de vie influence les concentrations des marqueurs osseux : la prise d'alcool, de tabac ou de caféine (facteurs de perte de masse osseuse) s'accompagne généralement d'une diminution des marqueurs tandis que l'exercice physique modéré sollicitant des os porteurs (facteur de gain osseux) s'accompagne d'une élévation de ces mêmes marqueurs.

## 2. Variation intra-individuelle des marqueurs osseux

C'est une notion extrêmement importante (et pas seulement pour les marqueurs osseux) dont il faut absolument tenir compte dans l'interprétation d'un suivi longitudinal (suivi de traitement par exemple). La variation intra-individuelle correspond au coefficient de variation que l'on obtient en mesurant un même marqueur plusieurs fois chez un même individu dont le statut osseux ne change pas pendant la période d'observation. Le problème généralement rencontré concerne les marqueurs qui présentent la plus grande variation (en moyenne) en réponse à un changement de statut osseux. Ce sont souvent ceux qui ont également la plus grande variabilité intra-individuelle. Schématiquement, les marqueurs sanguins sont proportionnellement moins sensibles que les marqueurs urinaires (sauf pour le CTX sérique), mais ils présentent également une variabilité intra-individuelle plus faible.

## 3. Variations des marqueurs au cours des pathologies osseuses

Les marqueurs sont le reflet du mécanisme physiopathologique de la maladie osseuse. Ils sont élevés dans les pathologies à haut remodelage (hyperparathyroïdies, hyperthyroïdie, maladie de Paget, etc.) et diminués dans les pathologies à bas remodelage (hypoparathyroïdie, hypothyroïdie, déficit en GH, etc.). Ils peuvent être par ailleurs les témoins d'un découplage entre l'activité ostéoblastique et l'activité ostéoclastique comme dans la maladie de Cushing où l'ostéocalcine (mais pas la phosphatase alcaline osseuse) est effondrée, témoin de l'activité du cortisol sur l'ostéoblaste, et les marqueurs de résorption augmentés, témoins de la relative hyperparathyroïdie secondaire constatée au cours de cette pathologie.
Tous les marqueurs n'ont pas la même sensibilité dans toutes les situations. Au cours de l'insuffisance rénale par exemple, la rétention des molécules normalement éliminées par le rein sera un obstacle à l'interprétation du marqueur. Dans cette situation, il semble que la phosphatase alcaline osseuse soit le paramètre de choix. Inversement, dans les traitements par de fortes doses de corticoïdes, la phosphatase alcaline n'est pas diminuée alors que l'ostéocalcine est effondrée, reflétant cette fois plus précisément la déplétion ostéoblastique. Ces discordances

ponctuelles entre les marqueurs de formation osseuse peuvent être le reflet de l'expression de ces marqueurs à des stades différents de la maturation de l'ostéoblaste. Le P1NP est plus particulièrement exprimé lors de la prolifération, la phosphatase alcaline lors de la maturation et l'ostéocalcine lors de la phase de minéralisation. Ainsi, dans une ostéomalacie on retrouvera un P1NP normal, témoin d'une synthèse de collagène normale, mais des phosphatases alcalines très élevées, reflet du défaut de minéralisation. L'ostéocalcine, quant à elle, est, d'une part, moins sécrétée, certainement en raison du déficit en vitamine D (le calcitriol est un puissant stimulateur de sa synthèse) et, d'autre part, relarguée en proportion plus importante dans la circulation, en raison peut-être de la plus faible capacité de captation de la matrice déminéralisée. La résultante est une concentration d'ostéocalcine souvent normale ou basse dans l'ostéomalacie.
Ces quelques éléments de réflexion montrent que le choix d'un marqueur peut dépendre de la pathologie à explorer et que, pour une bonne interprétation des résultats, il est important de bien connaître les caractéristiques physiologiques de la molécule à doser.

## D. Applications pratiques des marqueurs osseux dans l'ostéoporose

Les marqueurs osseux ont été largement évalués et validés à l'échelon de groupes de patients comme marqueurs de l'effet des traitements à visée osseuse ou bien comme outils de compréhension physiologique dans certaines situations. Leur utilisation en pratique clinique quotidienne à l'échelon individuel est en revanche récente et pas complètement consensuelle. Les marqueurs les plus intéressants à ce jour semblent être le P1NP, l'ostéocalcine et la phosphatase alcaline osseuse pour la formation osseuse, la désoxypyridinoline et les fragments de télopeptides (NTx ou *cross-laps*) pour la résorption osseuse.
L'ostéoporose est une pathologie du squelette caractérisée par une masse osseuse basse et une dégradation microarchitecturale du tissu osseux. Elle est définie par une densité minérale osseuse (DMO ; mesurée par absorptiométrie biphotonique) inférieure ou égale à 2,5 DS au-dessous de la DMO moyenne des adultes jeunes (c'est-à-dire ≤ – 2,5 T-score). La conséquence est une fragilité osseuse avec risque de fracture. Il est en effet bien établi que chaque diminution de DMO d'une DS double approximativement le risque fracturaire au moins chez les femmes ménopausées. L'ostéoporose est très souvent asymptomatique et les fractures et leurs complications en constituent les manifestations cliniques. Il s'agit d'une pathologie du vieillissement, surtout féminine, dont l'incidence augmente en même temps que l'espérance de vie, et qui apparaît actuellement comme un problème majeur de santé publique. La prévention est certainement le seul moyen pour réduire significativement la charge économique de l'ostéoporose. Il semble donc important de pouvoir détecter aussi tôt que possible les sujets qui seront particulièrement à risque de fracture, ce qui pourrait permettre de cibler une thérapeutique préventive. Il faut toutefois remarquer que la compliance à ces traitements (bisphosphonates, etc.) est très souvent médiocre. Une valeur basse de densité osseuse est prédictive d'un risque fracturaire important, mais une densité osseuse normale n'exclut absolument pas une perte osseuse ultérieure pouvant conduire rapide-

ment à l'ostéoporose. Cela est particulièrement vrai chez la femme à la ménopause. On peut prendre pour exemple l'évolution osseuse de deux femmes avec une densité osseuse à la moyenne au moment de la ménopause (supposée à 50 ans pour les deux). Si la première présente une perte osseuse vertébrale annuelle de 1 % (« perdeuse lente ») et la seconde une perte osseuse de 5 % (« perdeuse rapide »), elles seront respectivement ostéoporotiques (c'est-à-dire avec une densité osseuse ≤ – 2,5 T-score) à plus de 80 ans et 58 ans. On comprend que la seconde bénéficiera plus particulièrement d'une thérapeutique préventive et qu'il est important de l'identifier.
Une fois le contexte présenté, les applications des marqueurs osseux peuvent être définies de la façon suivante (résumé dans le *tab. 3*) :

**Tableau 3.** Indications potentielles de la densitométrie osseuse (DMO) et des marqueurs biologiques du remodelage osseux dans l'exploration des ostéoporoses

| | Densitométrie osseuse | Marqueurs osseux |
|---|---|---|
| Diagnostic de l'ostéoporose | Oui | Non |
| Prédiction de la perte osseuse future | Nécessité de pratiquer 2 examens distants d'environ 2 ans | Oui sur un dosage (mais imparfaitement) |
| Prédiction du risque fracturaire | Oui (chaque diminution d'une DS double le risque fracturaire) | Oui (d'une part, en prédisant la perte osseuse mais aussi indépendamment de la DMO) |
| Évaluation de l'efficacité (ou la compliance à) (d')un traitement | Pas à court terme, sauf avec le ranélate de strontium | Oui après 3 à 6 mois de traitement avec les bisphosphonates, les THS et le tériparatide |

Ces deux examens sont complémentaires. Schématiquement, la DMO donne des renseignements sur la masse osseuse (quantité d'os) à un instant donné alors que les marqueurs osseux proposent plutôt une information dynamique sur l'évolution de la DMO mais peut-être aussi sur la « qualité osseuse ».

## 1. Aide à la décision thérapeutique

Le développement de l'ostéoporose postménopausique dépend, d'une part, du pic de masse osseuse atteint peu après la puberté et, d'autre part, de la perte osseuse postménopausique. Au moment de la ménopause, on ne peut plus corriger le pic de masse osseuse alors que des progrès importants pour ralentir la perte osseuse ont été faits. La constatation d'une masse osseuse basse au moment de la ménopause n'indique pas si la perte osseuse est en cours ou si l'os a été perdu (ou non acquis) auparavant. La perte osseuse peut être évaluée par des mesures répétées de la DMO à condition d'espacer suffisamment les mesures (environ deux ans entre deux DMO).
Bien qu'ils n'aient pas d'intérêt pour le diagnostic de l'ostéoporose (ce diagnostic étant fondé sur la DMO), les marqueurs osseux semblent maintenant pouvoir être utilisés à l'échelon individuel pour aider à la décision thérapeutique chez certaines patientes (traiter si les marqueurs sont élevés, observer avec contrôle densitométrique dans deux ou trois ans s'ils sont normaux). Ils peuvent, en effet, prédire, toutefois imparfaitement, la perte osseuse postménopausique, le risque fracturaire chez la femme ménopausée (et cela, indépendamment de la DMO) ou la réponse à certains traitements antirésorbeurs (plus les marqueurs sont élevés avant le traitement, plus la réponse au traitement sera statistiquement importante). Toutefois, cela

signifie pas, par exemple, que la concentration d'un marqueur donné peut renseigner sur le taux exact de perte osseuse. Il faut plutôt les considérer comme des outils d'évaluation du risque De plus, le niveau de signification requis pour les études scientifiques ($p < 0,05$) n'est en général pas nécessaire (ou même impossible à obtenir) pour la plupart des décisions cliniques. Le cas de l'hypertension et de l'hyperlipidémie a récemment été évoqué pour étayer ce concept. Dans ce contexte, les cliniciens n'attendent pas d'avoir la « certitude statistique » que leurs patients seront victimes d'un AVC ou d'un infarctus s'ils ne sont pas traités pour instaurer un traitement. Il leur faut juste savoir que le risque est statistiquement augmenté.
Pour cet objectif d'aide à la décision thérapeutique, nul besoin de mesurer les marqueurs chez toutes les femmes ménopausées. La décision d'un traitement, en particulier antirésorbeur, ne pose pas de problème en présence d'une ostéoporose avec fracture ou d'une densité minérale osseuse particulièrement basse. En revanche, chez les femmes présentant une ostéopénie significative (c'est-à-dire une DMO entre – 1 et – 2,5 T-score), la mesure des marqueurs peut aider à décider de traiter en association avec d'autres facteurs de risque de fracture comme un faible poids corporel ou un antécédent familial de fracture ostéoprotique.

## 2. Suivi des traitements à visée osseuse

La thérapeutique antirésorptive vise à prévenir la perte osseuse ultérieure pour diminuer le risque fracturaire. Un gain osseux modéré de 2 à 5 % au rachis et 1 à 3 % à la hanche est même fréquent après un an de THS ou de traitement par un bisphosphonate. Cela signifie qu'il faut environ deux ans pour évaluer l'efficacité du traitement par une nouvelle mesure de la DMO. Il a été montré que les marqueurs osseux diminuent significativement après quelques semaines de thérapeutique antirésorptive, les marqueurs de la résorption diminuant plus précocement que les marqueurs de la formation. Ils ont donc été évalués comme outils de suivi des traitements à visée osseuse à l'échelon individuel. Ces études suggèrent que les variations des marqueurs osseux peuvent :

- permettre de juger de l'observance avant d'avoir la confirmation densitométrique de l'efficacité du traitement par un gain de DMO ;
- prédire la réponse en termes de DMO à des traitements antirésorbeurs comme les THS et les bisphosphonates.

Il sera important pour cette application de tenir compte de la variabilité intra-individuelle du marqueur utilisé. Autrement dit, une diminution du marqueur sous traitement supérieure à deux fois le CV intra-individuel représente un réel effet biologique. Des études récentes suggèrent que les marqueurs les plus performants pour ce type d'application sont les produits de dégradation peptidiques du collagène de type 1, c'est-à-dire le CTx (*cross-laps*) sérique et le NTx urinaire.
Puisque les marqueurs osseux sont utilisés pour évaluer l'efficacité d'un traitement (ou la compliance à ce traitement) ou pour identifier des sujets à risque d'ostéoporose, et donc cibler une thérapeutique préventive, ils pourraient aussi s'inscrire dans une stratégie de prévention de l'ostéoporose et engendrer alors, non pas à court terme mais plutôt sur le long terme, des économies de santé. Toutefois, des études coût-efficacité, et donc l'évaluation d'une éventuelle amélioration de la prise en charge des patients, sont nécessaires avant que ces paramètres biologiques

soient universellement reconnus comme des outils incontournables pour la prévention et l'exploration des ostéoporoses.

## L'essentiel de la question

Le maintien de l'homéostasie calcique est assuré par les hormones calcitropes (PTH, métabolites de la vitamine D). Pour une bonne interprétation d'un bilan phosphocalcique, il faut absolument bien connaître l'action de ces hormones sur les trois organes régulateurs que sont l'os, le rein et l'intestin. Il ne faut pas non plus négliger l'existence de fausses hypo- ou hypercalcémies liées le plus souvent, et respectivement, à une hypo- ou hyperalbuminémie. Il est donc conseillé de compléter un bilan phosphocalcique de base (calcémie, phosphatémie, calciurie des 24 heures) par un dosage d'albumine dans le sérum et d'utiliser une formule de correction pour la calcémie. Une hypocalcémie induira une sécrétion de PTH qui, elle-même, stimulera la transformation de la vitamine D en son métabolite le plus actif, la 1,25-dihydroxy vitamine D ou calcitriol. Une hypercalcémie aura pour conséquence de mettre au repos ce système hormonal. Une PTH qui ne serait pas freinée devant une hypercalcémie, ou non stimulée devant une hypocalcémie, témoignerait d'un dysfonctionnement des glandes parathyroïdes. En l'absence d'hypocalcémie, des déficits en vitamine D (surtout chez les sujets âgés) sont malgré tout fréquemment retrouvés. Ils peuvent être mis en évidence par la mesure de la 25-hydroxy vitamine D (et non pas de la 1,25-dihydroxy vitamine D). Ces déficits sont intéressants à détecter car ils sont facilement traitables alors qu'ils peuvent induire une hyperparathyroïdie secondaire avec fragilisation osseuse, en particulier au niveau de l'os cortical.

Un aspect particulier de l'exploration osseuse concerne les marqueurs biologiques du remodelage osseux. Ces paramètres, dont les plus intéressants à l'heure actuelle semblent être l'ostéocalcine, la phosphatase alcaline osseuse, le P1NP et les produits de dégradation télopeptidiques du collagène de type 1 (CTx et NTx), sont amenés à prendre de plus en plus d'importance avec la reconnaissance de l'ostéoporose comme véritable problème de santé publique. Ces marqueurs peuvent maintenant s'intégrer raisonnablement dans la pratique clinique quotidienne comme aide à la décision thérapeutique et dans le cadre des suivis de certains traitements à visée osseuse. Il faut insister sur le fait qu'ils ne peuvent en aucun cas remplacer la densitométrie osseuse mais qu'ils sont plutôt complémentaires de cet examen.

### *Pour en savoir plus*


- Bilezikian J., Marcus R. *The Parathyroids*. New York (États-Unis), Raven Press Ltd, 1994.
- Favus M. J. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 4[e] ed. Philadelphie (États-Unis), Lippincott Williams & Wilkins, 1999.
- Kuntz D. *Maladies métaboliques osseuses de l'adulte*. Paris, Flammarion Medecine-Sciences, 1996.
- *Rev Rhum* [suppl pédagogique] 1999 ; 66 (11) : 197272.
- Option/Bio. Supplément au numéro 188 (20 juin 1997).
- Paillard M. Physiologie rénale et désordres hydroélectrolytiques. Paris, Hermann, 1992.

# Les troubles de l'équilibre acide-base

P. DERACHE, F. LE MOIGNE, M. DARMON
Université Victor-Segalen, Bordeaux-II.

*Le maintien d'un équilibre stable entre les bases et les acides est une composante vitale de l'homéostasie de tout organisme vivant. Plus d'une centaine de diagrammes, d'équations, de nomogrammes et de règles d'utilisation a été établie pour évaluer l'équilibre acide-base. Loin de résoudre définitivement le problème, cette diversité a probablement contribué à la difficulté de compréhension de cet aspect de la physiopathologie par l'introduction de nouveaux termes et de nouvelles définitions.*
*L'équilibre acide-base est un des aspects de l'équilibre hydrominéral réputé pour être difficile de compréhension. Cela vient en grande partie de ce que l'on a une connaissance insuffisante dans la signification intrinsèque de termes aussi communs que « neutralité », « pH », « pression partielle d'un gaz », « acidose », « excès de base », etc. Dans ces conditions, il n'est pas surprenant d'observer des difficultés dans la compréhension des concepts, des combinaisons métaboliques et des syndromes décrits. Qui veut maîtriser ce sujet doit tirer sa connaissance, non seulement de la théorie telle qu'elle est enseignée, mais aussi et surtout de l'étude d'exemples cliniques. On n'oubliera pas que l'équilibre acide-base doit toujours être interprété dans le contexte de l'équilibre hydrominéral. L'étude de l'équilibre acide-base fait partie intégrante de la réanimation per- et postopératoire. Ce chapitre ne vise pas à fournir en détail les bases physico-chimiques de l'équilibre acide-base que l'on peut trouver facilement dans un cours de chimie analytique. Il se veut plutôt une aide dans l'interprétation des perturbations de ces équilibres. Dans le même esprit, le lecteur devra revoir le chapitre concernant la physiologie pulmonaire et rénale, et notamment les systèmes régulateurs. Pour comprendre les variations physiopathologiques de l'équilibre acide-base, il est indispensable de bien mémoriser deux types d'équations princeps : l'équilibre du système tampon bicarbonate et l'équation de définition du pH à partir de ce système. En raisonnant sur les autres systèmes tampons, on obtient les mêmes résultats. La partie intitulée « Rappels » ne fait pas partie de la question telle que nous pensons qu'elle doit être traitée, mais elle comprend des informations indispensables qui, en principe, doivent être connues avant d'aborder la question elle-même. En cas de doute, le lecteur pourra s'y référer. Par ailleurs, nous n'avons pas jugé nécessaire de présenter les diagrammes de Davenport ou les divers nomogrammes. Comme ils ne sont, à ce jours, plus utilisés dans l'interprétation des différents troubles de l'équilibre acide-base, une bonne connaissance de la chimie des solutions et des principales variations de l'équilibre acide-base suffit. Toutefois, le lecteur intéressé pourra les retrouver dans n'importe quel ouvrage de biochimie ou de physiologie.*

# I. Rappels

## A. Un peu de chimie des solutions

### 1. Qu'est-ce qu'un acide ? Qu'est-ce qu'une base ?

La conception moderne des acides et des bases est due à Johannes Brönsted et est étroitement liée aux problèmes cliniques. Généralement acceptée, elle définit les acides comme des substances qui sont des donneurs de protons et les bases comme des substances qui acceptent ce proton. En conséquence, les acides ne peuvent se

concevoir sans les bases et réciproquement. Quelques substances sont acide et base : l'exemple le plus classique est l'eau :

$$H_2O + H_2O \leftrightarrow H_3O^+ + OH^-$$

Les cations ($Na^+$, $K^+$, et $Mg^+$) sont des bases. Les bases tampons (bicarbonates et protéines) sont des anions.

## 2. Qu'est-ce que le pH ?

Le pH (potentiel hydrogène) se définit comme l'inverse du logarithme décimal de la concentration en proton $H^+$. Un pH égal à 7 définit la neutralité d'une solution. En dessous, cette solution sera acide, au-dessus, cette solution sera alcaline. Chez un sujet sain, le pH artériel est maintenu entre 7,35 et 7,45. En dessous de ces valeurs, on parlera d'acidémie due à une acidose, au-dessus, on parlera d'alcalémie due à une alcalose. La principale source des protons est le catabolisme des carbohydrates (sucres), des lipides (graisses) et des protéines. Concernant le glucose, ces métabolismes produisent du $CO_2$. Le dioxyde de carbone réagit avec l'eau pour donner l'ion bicarbonate selon les réactions :

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O \quad (1)$$

$$CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^- \quad (2)$$

Cette deuxième équation est l'équation fondamentale de l'équilibre acide-base chez l'homme. La célèbre équation d'Henderson-Hasselbach n'est rien d'autre qu'une transformation logarithmique de l'*équation* 2, en appliquant les lois d'action de masse et connaissant la constante de dissociation de l'acide carbonique. Cette équation se définit de la comme suit :

$$pH = pKa + \log\frac{[HCO_3^-]}{[H_2CO_3]}$$

avec pKa = 6,1.

Compte tenu de l'équilibre avec l'anhydride carbonique et en introduisant le coefficient de solubilité (a) du dioxyde de carbone (loi de Henry sur la solubilité des gaz en solution), on peut introduire dans l'équation ci-dessus la pression partielle en $CO_2$ :

$$pH = 6{,}1 + \log\frac{[HCO_3^-]}{a \times pCO_2}$$

avec $pCO_2$ exprimé en mm de Hg et a = 0,03.

Le pKa d'un système tampon est une valeur particulière pour laquelle les concentrations en acide et en bases sont identiques. Dans cette zone, la solution exerce un effet tampon maximum, c'est-à-dire qu'elle s'oppose à toutes variations brutales du pH. Une remarque doit être faite à ce niveau. Le système tampon acide carbonique-bicarbonates n'est certainement pas le système tampon le plus efficace de l'organisme, puisque le pH des liquides extracellulaires à tamponner se situe autour de 7,40. Il tire son efficacité de sa position physiologique : directement relié à la fonction pulmonaire, il est facilement exploré et directement accessible à l'analyse. Cette équation comporte pratiquement tous les éléments nécessaires à la compréhension de l'équilibre acide-base. Les bicarbonates représentent la composante métabolique et rénale

de l'équilibre, la pression partielle en $CO_2$ représente sa composante pulmonaire. Tout le jeu de cet équilibre est de savoir comment ces trois paramètres vont varier et dans quel sens. La difficulté (ou même l'aversion) que peuvent éprouver certains étudiants en la matière vient de ce que ces paramètres varient en sens inverse les uns des autres, et que beaucoup ont oublié les deux équations princeps présentées ci-dessus. En tout état de cause, l'étude de l'équilibre acide-base intègre non seulement ces trois paramètres, mais aussi l'équilibre hydrominéral et surtout le contexte clinique.

Le problème de l'équilibre acide-base peut se résumer dans le maintien de la concentration des ions $H^+$ produits par le métabolisme cellulaire dans des limites très étroites, compatibles avec la physiologie cellulaire. Chez l'homme normal, l'équilibre est maintenu par deux mécanismes régulateurs :

- en gardant l'élimination des protons égale à leur production ;
- en tamponnant les ions $H^+$ de telle façon que la concentration de l'ion hydrogène libre soit dans des limites compatibles avec les marges physiologiques.

Ainsi, le proton produit par voie métabolique (*réaction n° 2*) doit être éliminé par l'organisme sous forme de dioxyde de carbone et d'eau. En d'autres termes, le produit terminal du catabolisme est le $CO_2$ gazeux, lequel pourra être éliminé par voie pulmonaire, mais après un processus de transport extracellulaire du $CO_2$ de la cellule jusqu'à l'alvéole pulmonaire.

En effet, le $CO_2$ produit par voie métabolique réagit avec l'eau dans la cellule pour former des protons et des ions bicarbonates. Cette réaction se développe également dans le liquide interstitiel, dans le plasma et dans le globule rouge.

La *réaction 2* montre aussi que la quantité de protons et la quantité de bicarbonates produites sont égales. Cependant la quantité de proton est très faible, parce que sa production est tamponnée par les systèmes tampons de l'organisme. Finalement, l'équation d'Henderson-Hasselbach peut être mémorisée de la façon suivante :

$$pH = 6{,}1 + \frac{\text{rein}}{\text{poumon}}$$

La valeur de ces trois variables, toutes mesurables sur les appareils de laboratoire, constitue l'investigation fondamentale qui renseigne à tout moment sur l'état acidobasique du patient. Connaissant deux de ces valeurs (en général, pH et $pCO_2$), on peut en déduire par le calcul la troisième (bicarbonates, le plus souvent). Autrefois, on reportait deux de ces trois valeurs sur un diagramme de Davenport (ou autres nomogrammes divers), puis on en déduisait la troisième et on situait le patient dans une zone correspondant à l'état de l'équilibre acide-base. À côté de ces paramètres, il conviendra d'ajouter les paramètres d'oxygénation ($paO_2$, $SaO_2$) et l'ionogramme plasmatique et urinaire.

## 3. Qu'est ce qu'une solution tampon ? Rôle des systèmes tampons

Un mélange d'un acide faible et d'une base forte (ou d'un acide fort et d'une base faible) est appelé « système tampon » parce que, dans des conditions particulières, l'addition de protons (ou d'ions hydroxyles) n'a que peu d'influence sur le pH de ce mélange.

La *réaction 2* ne décrit que partiellement la réalité, car elle ne montre pas comment le proton est relié aux autres systèmes tampons de l'organisme ni comment le bicarbonate est équilibré par le $Na^+$ et le $K^+$.

Il est pratiquement impossible de représenter intégralement les relations quantitatives entre le proton, d'une part, et les bicarbonates et les protéines, d'autre part. La figure ci-dessous illustre les principales interrelations des systèmes tampons du plasma.

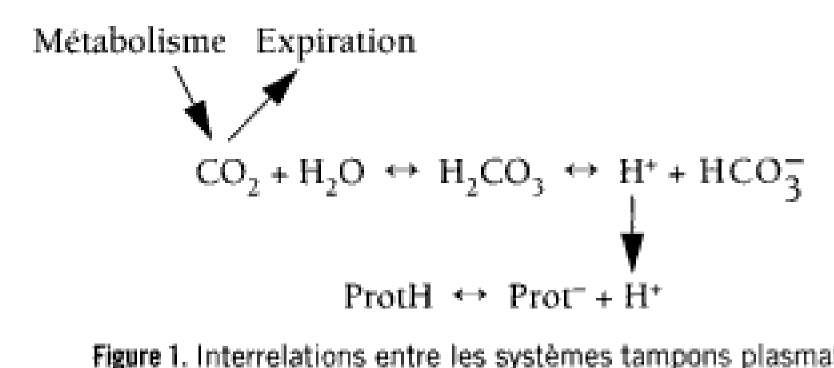



**Figure 1.** Interrelations entre les systèmes tampons plasmatiques

Ce schéma explique comment les protons sont pris en charge par les systèmes tampons plasmatiques de l'équilibre acide-base tel que l'on peut l'analyser au laboratoire. Il est toutefois incomplet, car il est évident que tous les systèmes tampons de l'organisme sont en équilibre les uns avec les autres, en particulier le squelette et les systèmes tampons intracellulaires qui, eux, sont inaccessibles à l'analyse courante. L'étude de l'équilibre acide-base consiste donc à comprendre comment ces différents facteurs interagissent les uns avec les autres. L'équilibre acide-base sera mieux compris en ayant présent à l'esprit tous les systèmes tampons de l'organisme. C'est de cette manière que l'on pourra évaluer correctement les paramètres cliniques de l'équilibre acide-base. Par ailleurs, il sera nécessaire de rechercher l'origine de la perturbation de l'équilibre acide-base (cause primaire) afin de pouvoir suivre correctement le sens des compensations.

## 4. Systèmes tampons de l'organisme

Ce sont des acides ou des bases faibles et leurs ions associés qui empêchent les variations brutales de la concentration du proton et donc du pH. Ils servent de systèmes de transport vers ou à partir des organes régulateurs (rein ou poumon).
Le secteur extracellulaire est le seul compartiment accessible à l'analyse courante au laboratoire de biochimie clinique. L'examen de la position physiologique du système bicarbonate montre qu'il s'agit d'un système ouvert, en raison de la rapide diffusibilité du $CO_2$. On remarquera que, d'un point de vue purement chimique, ce n'est pas un système tampon efficace (pK = 6,1). Mais son accès direct au poumon en fait un système très efficace du point de vue physiologique. Le système tampon des phosphates est chimiquement plus efficace (pK = 6,8), mais sa concentration plasmatique est faible. Le système tampon apporté par les protéines présente un pK variable et apporte, pour une concentration de 72 g/L, environ 17 mmol/L de système tampon.

**Tableau 1.** Principaux systèmes tampons de l'organisme

| Secteur extracellulaire | Secteur intracellulaire | Os | Urine |
|---|---|---|---|
| $H_2CO_3/HCO_3^-$ | Protéines/protéinates | $CaCO_3$ | $H_2CO_3/HCO_3^-$ |
| $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ | $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ | | $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ |
| Protéines/Protéinate | Hémoglobine/hémoglobinate | | $NH_3/NH_4^+$ |

Le secteur intracellulaire comporte les systèmes tampons bicarbonates et hémoglobine. Le système hémoglobine-hémoglobinate est très efficace, grâce à sa concentration et à son pK (pK = 7,8).
Leur répartition entre les systèmes extracellulaires et intracellulaires, accessibles à l'analyse, peut se décomposer comme suit :

- plasma :
  - bicarbonates : 33 % du pouvoir tampon du sang total,
  - phosphates : 2 % du pouvoir tampon du sang total,
  - protéines : 12 % du pouvoir tampon du sang total ;
- érythrocytes :
  - hémoglobine : 36 % du pouvoir tampon du sang total,
  - bicarbonates : 10 % du pouvoir tampon du sang total,
  - phosphates : 7 % du pouvoir tampon du sang total.

On ne doit pas oublier que tous les systèmes tampons de l'organisme participent au maintien de l'équilibre acide-base, y compris le squelette.
Le but du jeu est maintenant de comprendre comment ces différents acteurs varient les uns par rapport aux autres, pour que le pH extracellulaire soit régulé dans des conditions physiologiques acceptables. Finalement, en clinique, nous avons deux acteurs de cet équilibre : la $pCO_2$ (composante pulmonaire) et les bicarbonates (composante métabolique simplifiée), le pH n'étant que la conséquence de la variation des deux acteurs précédents.

## B. Variations du pH : causes des acidoses et des alcaloses

Les variations du pH altèrent le degré d'ionisation des protéines (enzymes) et de nombreuses substances (médicaments). Dans ces conditions, il n'est pas étonnant que ces variations aient des répercussions sur le métabolisme. De nombreuses substances ionisées ne peuvent pas traverser rapidement les membranes cellulaires. Les altérations du pH affecteront à la fois les fonctions cellulaires et le potentiel thérapeutique de nombreuses substances pharmacologiques. La relative acidité des tissus (par exemple les environs d'un foyer infectieux) est connue pour réduire l'efficacité des anesthésiques locaux. Inversement, l'alcalinité augmente leur efficacité. L'alcalinité potentialise les effets de drogues (mépéridine, morphine) par augmentation de l'aptitude d'une base lipophile non chargée à traverser la barrière hémato-encéphalique.
Afin de comprendre la genèse d'une acidose, et donc celle des alcaloses, on peut retenir schématiquement quatre causes principales de l'acidose primaire :

- élimination du $CO_2$ déficitaire (hypercapnie) ;
- apport insuffisant d'oxygène (hypoxie), ce qui réduit la neutralisation du proton par formation d'eau ;
- production anormale d'acides cétoniques, les plus importants étant l'acide acétoacétique et l'acide 3-hydroxybutyrique, produits en quantité excessive pendant la mobilisation lipidique du diabète ou du jeûne ;
- élimination rénale des acides non volatils insuffisante.

Les troubles de l'équilibre électrolytique sont également la cause de perturbation de l'équilibre acide-base.

## 1. Élimination insuffisante du $CO_2$

La majeure partie du $CO_2$ est produite par le métabolisme des sucres et des graisses. Une partie est produite par le métabolisme des protéines. Le $CO_2$ produit dans les cellules diffuse dans le liquide extracellulaire. Une partie des protons est tamponnée par les bicarbonates et les protéines, mais la plus grande partie est transportée à l'intérieur des globules rouges. Malgré la diffusion hors du globule rouge des ions bicarbonates (échangés contre des chlorures), la plupart du $CO_2$, sous forme de bicarbonates et de carbaminohémoglobine (rôle tampon de l'hémoglobine), est transporté vers les poumons. Cette réaction (2) est favorisée de la gauche vers la droite par l'anhydrase carbonique érythrocytaire. Normalement, la masse de $CO_2$ éliminée par unité de temps est égale à sa production métabolique (treize moles produites quotidiennement par le métabolisme). Il en résulte très peu de variations du pH. Si l'élimination du $CO_2$ décroît (production supérieure à l'élimination, d'où hypercapnie), la concentration en proton augmente et le pH diminue : c'est l'acidose respiratoire. À l'inverse, si la respiration est accélérée, (élimination supérieure à la production d'où hypocapnie) la $pCO_2$ diminue et le pH augmente, c'est l'alcalose respiratoire. Le simple examen du dénominateur de l'équation d'Henderson-Hasselbach suffit à faire comprendre la mécanique. Les variations du pH dues à la variation de la $pCO_2$ sont rapides et brutales (quelques secondes) parce que le système tampon est un système ouvert. Le retour à la normale sera tout aussi rapide, une fois les causes du trouble levées.

## 2. Insuffisance d'apport en oxygène et anomalies du métabolisme du glucose

Pour chaque mole de glucose dégradée, 2 moles de protons sont libérées. Si l'oxygène est disponible en quantité suffisante, de l'eau et de l'énergie sont produits. Dans le cas contraire (hypoxie), la glycolyse fonctionne en anaérobiose et de l'acide lactique s'accumule induisant une consommation de base (bicarbonate) qui provoque ce que l'on nomme une « acidose métabolique ». Le simple examen du numérateur de l'équation d'Henderson-Hasselbach suffit à expliquer la mécanique. De telles situations peuvent se trouver dans des cas de paralysie respiratoire, d'arrêt cardiaque, de contraction isométrique des muscles ou de compression du cordon ombilical – en fait toutes situations d'hypoxie tissulaire. D'autres cas peuvent entraîner une acidose métabolique par production d'acide lactique : intoxication par les biguanides, inhibition de l'oxydation aérobie du glucose, intoxications aiguës par l'éthanol, l'isoniazide, ou par administration d'adrénaline. Les cirrhoses avancées, les comas hépatiques et les pancréatites sont également causes d'acidoses métaboliques. Toutes ces acidoses sont caractérisées par une augmentation du trou anionique (voir sa définition *plus loin*).

## 3. Production de l'acide acéto-acétique et de l'acide3-β-hydroxybutyrique

L'exemple classique est l'acidocétose du diabétique de type 1, par exagération du catabolisme des acides gras. Ici aussi, la production exagérée d'acides cétoniques (corps cétoniques) consomme des bases. Cette situation suffit à faire chuter le pH. En regardant de près ces mécanismes, on pourrait remarquer que les conséquences, notamment énergétiques, de cette situation sont identiques à celles que produit l'hypoxie. Dans les deux cas, nous aboutissons à un déficit énergétique cellulaire.

## 4. Élimination insuffisante des acides non volatils (par opposition au $CO_2$) par le rein

Le rein élimine environ 100 à 200 mmoles de protons produits du métabolisme cellulaire par 24 heures. Dans ces cas, les variations du pH sont plus lentes lorsqu'elles sont d'origine rénale (quelques heures). Le rein participe au maintien de l'équilibre acide-base par trois systèmes tampons :

- le système bicarbonate avec régénération et réabsorption des bicarbonates (intervention rénale) ;
- le système des phosphates (permettant l'excrétion du proton sous forme phosphate monosodique) ;
- le système de l'ammoniac (permettant l'excrétion du proton sous forme d'ion ammonium).

## C. Relation entre l'équilibre hydroélectrolytique et l'équilibre acide-base

L'étroitesse des relations entre l'équilibre acide-base et le métabolisme hydroélectrolytique impose que soient étudiés dans le même temps tous les paramètres de ces deux équilibres. Ces équilibres sont régis par deux grandes lois physiques et une loi physiologique :

- la loi de neutralité électrique ;
- la loi d'iso-osmolalité ;
- le maintien du pH dans des zones physiologiques.

La loi de l'équilibre électrique impose que la somme des charges négatives soit égale à la somme des charges positives. Dans le plasma, il y a 153 mmol/L de cations, il y aura donc 153 mmol/L d'anions. Cette loi est valable pour tous les compartiments de l'organisme.

La loi de l'iso-osmolalité précise que, à l'équilibre, l'osmolalité est la même dans les différents systèmes liquidiens entre lesquels l'eau est échangeable. L'osmolalité sera donc la même dans le plasma, le liquide interstitiel et les liquides intracellulaires. Dans tous ces compartiments, elle se situe aux environ de 285 mOsm/L. L'eau circule librement entre les compartiments. Si le nombre de particules dissoutes s'accroît dans un compartiment, l'eau fera de même jusqu'à ce qu'un nouvel équilibre soit atteint.

Quelquefois, les lois d'équilibre électrique et d'équilibre osmotique peuvent interférer entre elles. Cela est observé lorsque des membranes semi-perméables sont présentes. L'eau circule librement, mais les ions dissous sont soumis à des transports actifs. Il existera une différence de potentiel entre les deux parois de la membrane. La semi-perméabilité des membranes est responsable de l'établissement de l'équilibre de Donnan. L'exemple classique est la différence électrolytique entre le plasma et le liquide interstitiel. Les protéines plasmatiques ne peuvent pas passer la membrane. Il en résulte une concentration en bicarbonates en chlorure supérieure dans le liquide interstitiel.

La troisième règle est le contrôle physiologique qui maintient le pH dans les zones compatibles avec un métabolisme normal.

La meilleure approche des interactions des deux équilibres hydroélectrolytique et acide-base est la construction du diagramme de Gamble, qui est une représentation graphique de la loi de neutralité appliquée au plasma. La hauteur des deux colonnes donne une idée de la balance hydrique.

Dans le plasma, le cation prédominant est le sodium (142 mmol/L). Le potassium, le calcium s'ajoutent, soit un total de 153 mmol/L. Selon la loi d'électroneutralité, les anions doivent être équivalents à 153 mmol/L. Il s'agit des chlorures (101 mmol/L), des bicarbonates (24 mmol/L) et des protéines (17 mmol/L). Le reste est représenté par les anions dits « résiduels », phosphates, sulfates, lactates et acides organiques.

La somme bicarbonates et protéines est appelée « bases tampons extracellulaires » soit 24 + 17 = 41 mmol/L. Il est habituel de dire que les bicarbonates représentent la composante métabolique de l'équilibre acide-base. Cependant, l'estimation des bases tampons extracellulaires est le meilleur paramètre d'évaluation de la composante métabolique de l'équilibre acide-base. La principale raison est que le taux de bicarbonate est directement influencé par la $pCO_2$. Finalement, en utilisant les informations apportées par la détermination des bases tampons, on peut connaître en même temps l'état de l'équilibre électrolytique et l'état de l'équilibre acide-base.

Dans des pathologies du type acidocétose diabétique, le patient peut présenter un déficit de base de 20 mmol/L. Les bases tampons seront alors de 41 – 20 = 21 mmol/L. Puisque la neutralité électrique doit être respectée, on observera soit une augmentation équivalente des anions résiduels, soit une diminution de la concentration des cations. En pratique, les deux types de compensations sont observés : augmentation des anions organiques (cause de l'acidose) et changement de la concentration des cations et des chlorures.

Dans l'alcalose métabolique, les bases tampons augmentent. De la même manière, la neutralité électrique impose une décroissance des chlorures ou une augmentation du sodium. Les autres cations subissent peu de changement à cause de leur faible concentration. Sauf dans certaines situations cliniques particulières, les anions résiduels ne changent jamais. D'autre part, l'organisme tente de rétablir les lois d'iso-osmolalité, la concentration en sodium ne devrait donc pas changer et l'on observera seulement une diminution des chlorures. En d'autres termes, on n'observe jamais d'alcalose métabolique sans baisse des chlorures plasmatiques. D'une manière simplifiée, on peut dire que dans l'alcalose métabolique les bases tampons augmentent aux dépens des chlorures.

Il faut remarquer que la concentration des bicarbonates n'est fonction ni de sa production ni de son élimination, mais dépend plutôt de l'excédent des cations sur les anions. En principe, la concentration du sodium, du potassium et des sulfates ne change pas rapidement et est souvent présentée comme les « ions fixes ». À l'inverse, le taux des bicarbonates peut s'adapter très rapidement à différentes situations. Si la concentration des bicarbonates décroît de façon significative, les lactates augmenteront de façon similaire.

Une des façons de bien comprendre l'équilibre acide-base et hydroélectrolytique est celle qui consiste à reporter les données de l'analyse sur le diagramme de Gamble (*fig. 1*). Si cela peut être fait dans un certain nombre de cas cliniques, il devient aisé d'appréhender les différents facteurs qui composent l'équilibre acide-base et hydroélectrolytique. Même si tous les ions ne sont pas mesurés, cette manière de faire peut permettre d'obtenir une estimation. Certains insistent sur la détermina-

tion complète des paramètres de l'équilibre acide-base. Celle-ci est souvent superflue : une connaissance élémentaire du diagramme de Gamble permet d'éviter des analyses non nécessaires.
Le potassium, le calcium et le magnésium, comptant pour environ 11 mmol/L, sont approximativement égaux à la concentration des anions résiduels, le diagramme de Gamble peut être simplifié. Ainsi, on peut montrer que le sodium plasmatique est à peu près égal à la différence de concentration entre les chlorures plasmatiques et les bases tampons. En d'autres termes, les bases tampons sont égales à la différence entre la concentration des chlorures et celle du sodium :

$$\text{Bases tampons} = Na^+ - Cl^-$$

À la lecture de cette équation, nous avons d'une part la composante métabolique de l'équilibre acide-base et, d'autre part, les deux principales composantes de l'équilibre hydroélectrolytique. La liaison entre ces deux compartiments devient évidente.
Si l'on souhaite utiliser l'excès de base ou *base excess* (BE), voir *plus loin*, l'équation peut s'écrire de la manière suivante :

$$BE + 41 = Na^+ - Cl^-$$

ou

$$BE - Na^+ = Cl^- - 41$$

Ces simplifications sont possibles seulement si la concentration des anions résiduels ne change pas, à l'inverse de ce qui peut être observé dans les situations cliniques suivantes : cétose du diabète, accroissement des lactates, intoxication par les salicylés ou par le méthanol, insuffisance rénale. En d'autres termes, une restriction doit être faite dans l'utilisation de ces simplifications. Elles supposent que les bases tampons sont normales, c'est-à-dire que le patient n'a pas de troubles métaboliques de l'équilibre acide-base.
Quelquefois la concentration protéique est très basse comme cela peut s'observer dans certaines néphroses. Dans ce cas, une valeur des bases tampons de 33 mmol/L pourrait être non pas le signe d'une acidose métabolique, mais une valeur explicable par une concentration abaissée de 72 g/L à 36 g/L.
Pour éviter ces erreurs d'interprétation possibles, on préfère utiliser la valeur de l'excès de base ou du déficit de base (BD) qui ne varie pas, chez un sujet normal, s'il n'y a pas de perturbations métaboliques de l'équilibre acide-base. Cette valeur du BE ou BD est voisine de zéro.

$$BD = BE = \text{Base tampon} - \text{Base tampon normale}$$

## D. Trou anionique

Le trou anionique peut se définir comme étant la somme des anions non mesurés dans un bilan de réanimation classique (phosphates, sulfates, anions acides organiques). Ce sont en fait les anions résiduels (anions fixes ou non volatils) dont on a parlé plus haut. Ces anions sont typiquement associés avec le proton dès qu'ils sont générés dans les liquides de l'organisme. Il est habituellement calculé de la manière suivante :

$$\text{Trou anionique} = Na^+ + K^+ - Cl^- - HCO_3^-$$

Les valeurs usuelles sont comprises entre 12 et 20 mmol/L.

Un trou anionique supérieur à 22 mmol/L indique une acidose métabolique :
- accumulation d'acides organiques :
  - accumulation d'acide lactique (acidose lactique) ;
  - accumulation d'acides cétoniques (diabète acidocétosique).
- accumulation de phosphates et de sulfates (insuffisance rénale) ;
- ingestions de toxines.

Une exception peut être observée : il s'agit de la perfusion de sels d'anions organiques (lactates, acides aminés, hautes doses de pénicilline).

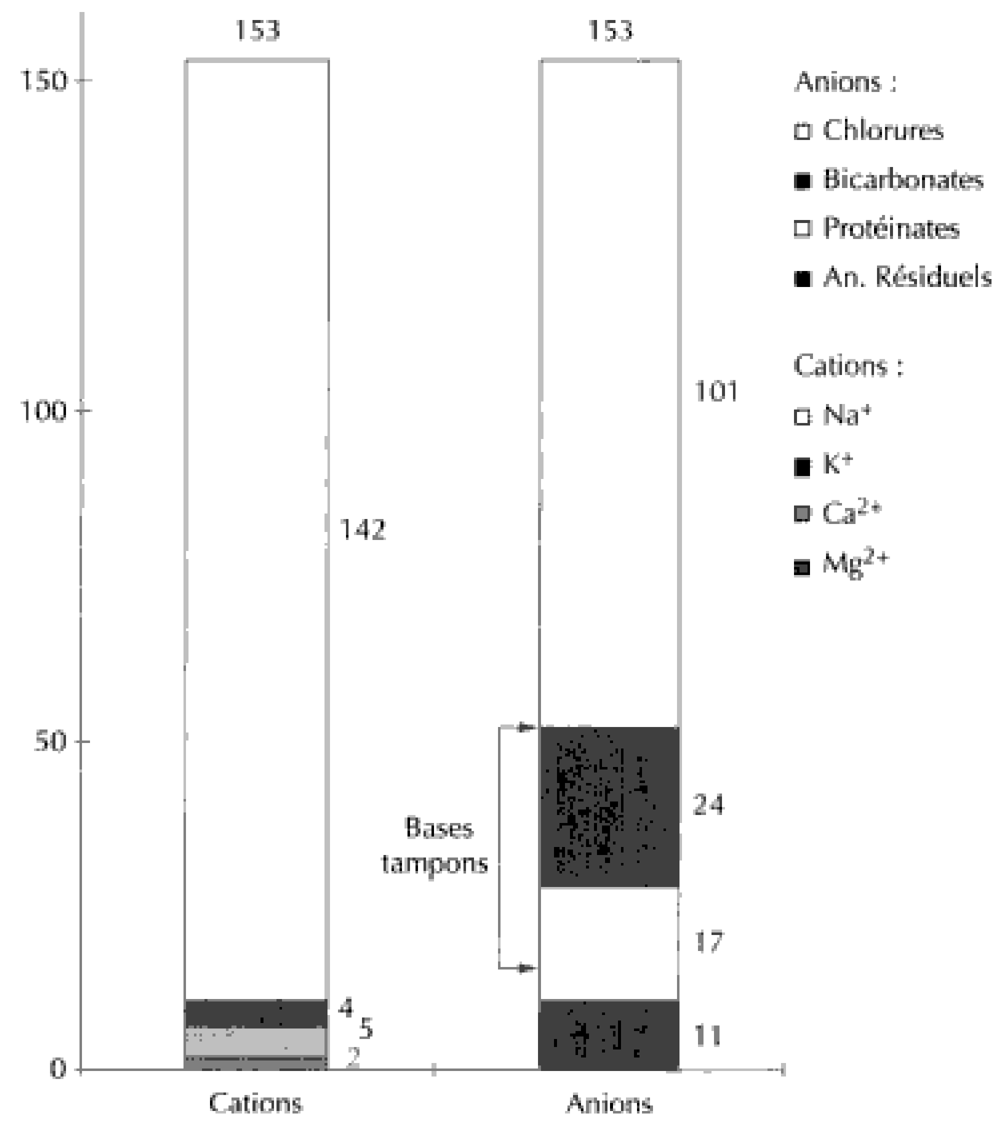



**Figure 2.** Diagramme de Gamble

## E. Un peu de technique

### 1. Mesure du pH

Au laboratoire de biochimie clinique, l'électrode de mesure du pH est une électrode de verre à membrane solide. Cette électrode est miniaturisée. La différence de potentiel est obtenue par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl ou au calomel $Hg/HgCl_2$.

## 2. Mesure de la $pCO_2$

Cette électrode, mise au point par John W. Severinghaus, est constituée d'un bloc unique incluant le couple électrode de verre à pH-électrode de référence. Elle est remplie d'une solution de bicarbonate de sodium. Une membrane amovible en silicone est sélectivement perméable au gaz ($CO_2$) qui, après diffusion, entre en contact avec la solution de bicarbonate. La variation de pH de cette solution est proportionnelle au $CO_2$.

## 3. Mesure de la $pO_2$

La mesure électrométrique de la $pO_2$ utilise une méthode polarographique. Le fonctionnement de cette électrode (électrode de Clark) repose sur le principe suivant : lorsqu'une électrode de platine est polarisée négativement (cathode) par rapport à une électrode de référence et lorsque le système est plongé dans une solution contenant de l'oxygène dissous, la réduction de l'oxygène au contact de la cathode produit une dépolarisation partielle de celle-ci. L'augmentation de la polarisation de la cathode conduit à une réduction de l'oxygène par deux puis par quatre électrons. Pour une concentration donnée en oxygène, sa réduction donne naissance à un courant de dépolarisation dont l'intensité est mesurée. La cellule de mesure est constituée d'une cathode de platine et d'une anode de référence Ag/AgCl, reliées par un électrolyte (KCl). Elle est séparée du milieu à analyser par une membrane perméable aux gaz.

# F. Valeurs usuelles

Les valeurs usuelles citées ici s'entendent pour des prélèvements artériels. Les valeurs usuelles pour des prélèvements capillaires sont légèrement différentes. Le *tableau 2* reprend les valeurs indiquées dans la banque du Centre national de l'internat en pharmacie, sauf les valeurs du base excess.

**Tableau 2.** Valeurs usuelles

| | | |
|---|---|---|
| Sg-a pH | 7,35 – 7,45 | |
| Sg-a $pCO_2$ | 4,6 – 6 kPa | 35 – 45 mm de Hg |
| Sg-a $pO_2$ | 10,6 – 13,3 kPa | 80 – 100 mm de Hg |
| Sg-a $SaO_2$ | 0,94 – 1,00 | 94 % – 100 % |
| Sg-a bicarbonates | 22 – 26 mmol/L | |
| Sg-a $CO_2$ total | 26 – 30 mmol/L | |
| Base excess | – 2 à + 2 | |

## G. Équilibre acide-base : principales étapes

### 1. Métabolisme de l'ion hydrogène et homéostasie

#### a) Régulation de la concentration en protons

- Normalement, la concentration du proton extracellulaire est régulée dans d'étroites limites : 45 à 35 nanomoles/L, c'est-à-dire pH compris entre 7,35 et 7,45.
- pH limite compatible avec la vie : 6,8-7,8.

#### b) Équilibre des acides

- Augmentation ou diminution transitoire de la production ou des entrées du proton.
- L'addition ou la soustraction du proton des liquides de l'organisme comporte deux phases :
  - précoce : par la réaction avec les systèmes tampons extra- ou intracellulaires ou par le changement de la ventilation alvéolaire pulmonaire (variation de la $pCO_2$).
  - tardive : par la réponse rénale, c'est-à-dire élimination des acides non-volatils, réduction de l'excrétion nette du proton.

L'équilibre du proton implique trois processus :
- action sur sa production du proton ;
- action des systèmes tampons intra- et extracellulaires ;
- régulation physiologique de l'excrétion.

#### c) Production des acides

- Acide volatil (excrété par voie pulmonaire). Il s'agit du $CO_2$, produit de l'oxydation complète du métabolisme des glucides, des lipides et des protéines. Sa production est de l'ordre de 13 000 mmol/jour.
- Acides non volatils (fixes) principalement excrétés par le rein. Leur production journalière est comprise entre 1 et 1,5 mmol/kg.
- Sources principales des acides non volatils :
  - les sulfures contenus dans les protéines et les acides aminés (la cystéine et la méthionine conduisent à la production de $H_2SO_4$) ;
  - la conversion des produits alimentaires neutres en acides organiques ;
  - les sucres sont convertis en acides lactique, citrique, pyruvique ;
  - les graisses sont converties en acides cétoniques (acide β-hydroxybutyrique) ;
  - hydrolyse des esters phosphoriques en $H_3PO_4$.

#### d) Régulation physiologique : échanges cellulaires et potassium

■ *Niveau tissulaire*

- En acidose, le proton entre dans la cellule en échange du sodium et du potassium, régénération des bicarbonates extracellulaires.
- En alcalose, le proton quitte la cellule en échange du sodium et du potassium, consommation de bicarbonates extracellulaires.
- L'acidose aiguë tend à augmenter la kaliémie, l'alcalose aiguë tend à la diminuer.

- Il n'y a pas de bonne relation entre les variations de la kaliémie et les changements du pH, la relation est plutôt qualitative. Les changements de la kaliémie sont classiques dans les désordres métaboliques (acidose lactique). Les changements de la kaliémie sont moins prévisibles dans les désordres respiratoires.

#### ■ *Niveau érythrocytaire*

Le système tampon de l'hémoglobine est de première importance dans les désordres respiratoires et dans le transport du $CO_2$.

$H_3CO_3$ + Hb ↔ H/Hb + $HCO_3^-$ (participation à l'échange chlorure/bicarbonates)

## 2. Régulation rénale de l'équilibre acide-base

Dans ce domaine, le rôle du rein est de réguler la concentration des bicarbonates du secteur extracellulaire par deux processus : récupération des bicarbonates filtrés et régénération des bicarbonates consommés.

### a) Récupération des bicarbonates filtrés

- La charge filtrée des bicarbonates est de 5 100 mmol par jour. Normalement, plus de 95 % de cette charge sont récupérés par les tubules rénaux (surtout proximaux) pour prévenir l'acidose.
- La concentration plasmatique des bicarbonates est comprise entre 25 et 28 mmol/L. Pour une concentration inférieure à 25 mmol/L, la récupération est complète. En d'autres termes, aucun bicarbonate n'est excrété. Pour une concentration comprise entre 25 et 28 mmol/L, le taux des bicarbonates urinaires est insignifiant. Au-delà de ces concentrations, le seuil de réabsorption des bicarbonates est dépassé, ils sont donc excrétés dans les urines.

### b) Régénération des bicarbonates consommés

- L'excrétion journalière des acides fixes est assurée par les systèmes tampons urinaires. Sans ces systèmes, une charge acide ne peut être éliminée parce que le pH minimum des urines est de 4, soit une concentration de 0,1 mmol/L. Mais des taux supérieurs à 50 mmol doivent être excrétés pour équilibrer la production métabolique du proton. Ainsi, sans les systèmes tampons, seulement 0,2 % de la charge acide minimum pourrait être éliminé.
- Les principaux systèmes tampons : il s'agit des systèmes phosphates monosodique/phosphate disodique d'une part, et du système ammoniac/ammonium d'autre part : $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ (pK = 6,8) et $NH_3/NH_4^+$ (pK = 9,3). Ensemble, ces deux systèmes sont capables d'éliminer 50 à 100 mmol/jour, l'excrétion de chaque mmole de proton génère une mmole de bicarbonate qui retourne dans les liquides de l'organisme. L'acidité titrable est égale à la masse d'alcali (soude) qu'il est nécessaire d'ajouter pour obtenir un pH égal au pH plasmatique. Cette acidité titrable est égale au proton excrété sous la forme de $H_2PO_4^-$ . L'excrétion nette d'acide est égale à l'excrétion des 24 heures de l'acidité titrable, diminuée de la concentration en $NH_4^+$ et en $HCO_3^-$.

On remarquera que l'action de la parathormone est biphasique (proximale et distale), le résultat net est une alcalose métabolique modérée, sinon absente.

**Tableau 3.** Facteurs régulant le transport du proton et des bicarbonates dans le tubule proximal

| | | Effet sur la sécrétion du proton<br>Effet de la réabsorption des bicarbonates |
|---|---|---|
| État de l'équilibre acide-base | Diminution du pH | Augmenté |
| | Augmentation de la $pCO_2$ | Augmenté |
| | Diminution des bicarbonates | Augmenté |
| $HCO_3^-$ luminal | Augmentation des bicarbonates ou du flux rénal | Augmenté |
| Facteurs neurohormonaux | Augmentation de l'angiotensine II | Augmenté |
| | Augmentation de la parathormone | Diminué |
| | Augmentation de l'activité nerveuse rénale | Augmenté |
| | Augmentation des glucocorticoïdes | Augmenté |

**Tableau 4.** Facteurs régulant la sécrétion du proton et la génération des bicarbonates dans le tubule distal.

| | | Effet sur la sécrétion du proton<br>Effet de la réabsorption des bicarbonates |
|---|---|---|
| État de l'équilibre acide-base | Diminution du pH | Augmenté |
| | Augmentation de la $pCO_2$ | Augmenté |
| | Diminution des bicarbonates | Augmenté |
| $HCO_3^-$ luminal | Augmentation des bicarbonates, de l'ammoniac ou des phosphates ou du flux rénal | Augmenté |
| Facteurs hormonaux | Aldostérone | Augmenté |
| | Augmentation de la parathormone | Augmenté |
| | AMP cyclique | Augmenté |

# II. Perturbations de l'équilibre acide-base

## A. Troubles métaboliques

### 1. Acidoses métaboliques

#### a) Définition

Il s'agit des modifications primaires de l'équilibre acide-base qui entament le stock de bases de l'organisme. Cette consommation est en partie reflétée par la baisse de la concentration des bicarbonates plasmatiques (valeurs usuelles comprises entre 22 et 26 mmol/L) ou excès de base négatif.

#### b) Pathogénie

- L'acidose métabolique se déclenche lorsqu'une surproduction d'acides endogènes (ou d'origine exogène) a lieu, par exemple dans le cas d'une cétose diabétique (ou d'intoxication).
- L'acidose métabolique peut également s'observer lorsqu'il y a une fuite du stock de bases, par exemple lors de diarrhées.

- L'acidose métabolique s'observe lorsque le rein n'est plus capable d'assurer l'excrétion des acides et la récupération des bases, par exemple lors de l'insuffisance rénale.

La réponse secondaire ou compensatoire consiste à ramener le pH dans des zones normales. Dans ce dessein, l'équation de Henderson-Hasselbach impose de faire baisser la $pCO_2$. On observe donc une augmentation de la ventilation pulmonaire (hyperpnée), conduisant à une hypocapnie (baisse de la $pCO_2$), ce qui suppose que la fonction pulmonaire est normale.

#### c) Symptômes et signes généraux

- La rapidité d'installation et la sévérité sont fonction de l'étendue des symptômes.
- Respiration de Kussmaul, fatigue, douleurs abdominales, vomissements.
- Dilatation artériolaire, hypotension et tachycardie, effet inotrope négatif sur le myocarde.

#### d) Étiologies

On classe les acidoses métaboliques en fonction de l'état du trou anionique.

### 2. Acidoses métaboliques avec trou anionique élevé

#### a) Insuffisance rénale

Habituellement, l'acidose ne se développe pas tant que la clairance de la créatinine n'est pas en dessous de 20 ml/mn. Les néphrites interstitielles sont responsables d'acidoses plus rapides que les glomérulonéphrites. La concentration plasmatique des bicarbonates se situe entre 15 et 20 mmol/L sans que le trou anionique dépasse 20 mmol/L. La production normale endogène des acides excède les capacités d'excrétion de ces acides. Les acides partiellement retenus sont en partie absorbés par les tampons osseux. Le mécanisme de l'acidose de l'insuffisance rénale est une chute de la biosynthèse de l'ammoniac, associée à une perte modérée de bicarbonates.

#### b) Cétoses (acidocétoses)

Normalement, les corps cétoniques, synthétisés par le foie, sont utilisés par le muscle squelettique, le myocarde et le rein. L'hypoxie et l'acidose lactique accentuent la production des corps cétoniques (acétoacétate et acide β-hydroxybutyrique). Des quantités anormalement élevées sont présentes dans le sang ou dans les urines, ce qui conduit à une cétose (cétonémie, cétonurie). Il existe des substances conduisant à une réaction de recherche des corps cétoniques faussement positive : ingestion de paraldéhyde, disulfirame (Antabuse), captopril.

■ *Pathogenèse*

À partir du tissu adipeux, il y a libération d'acides gras libres qui sont métabolisés par le foie en corps cétoniques. Il y a donc consommation de bicarbonates selon le schéma suivant :

$$\text{Acides cétoniques} + NaHCO_3 \rightarrow \text{bases cétoniques} + H_2O + CO_2$$

Soit :

$$\text{Acides hydroxybutyriques} + NaHCO_3 \rightarrow \text{hydroxybutyrate} + H_2O + CO_2$$

Les corps cétoniques sont normalement consommés par le muscle et les bicarbonates sont régénérés.

■ *Étiologies*

- *Diabète* : on peut observer une acidose métabolique avec un trou anionique élevé, évoluant vers une acidose hypochlorémique au cours du traitement.
- *Jeûne* : la concentration des bicarbonates plasmatiques descend rarement en dessous de 18-20 mmol/L en dépit d'un jeûne prolongé.
- *Alcool* : l'acidose métabolique est plus fréquente chez la femme, suivant l'ingestion d'alcool. Elle est souvent associée à des vomissements. Elle peut être associée également à une acidose lactique.
- *Isopropanol* : ce composé est métabolisé en acétone. L'intoxication conduit à la cétose puis au coma, mais sans acidose ni augmentation du trou anionique (l'acétone n'est pas un acide).

### c) Intoxications

■ *Aspirine*

L'enfant et l'adulte développent une alcalose respiratoire à cause des effets centraux de l'aspirine (hyperventilation). Les enfants, plus que les adultes, développent une acidose métabolique sévère, avec augmentation du trou anionique. Cela est dû aux effets métaboliques de l'aspirine. L'adulte aurait tendance à développer une alcalose respiratoire doublée d'une acidose métabolique, si bien que les bicarbonates sont bas mais le pH normal. Un œdème pulmonaire, des saignements, de la fièvre, un ictère, un syndrome de Fanconi peuvent compliquer la toxicité de l'aspirine. Le traitement met en œuvre une diurèse alcaline.

■ *Méthanol*

Le méthanol est absorbé par le tractus gastro-intestinal, la peau et les poumons. Le méthanol est métabolisé en acide formique. Une acidose formique peut se développer après une période de latence de 12 à 36 heures après l'ingestion (temps nécessaire à son métabolisme). L'éthanol inhibe la conversion du méthanol en acide formique.

■ *Éthylène glycol (antigel)*

Ce composé est métabolisé selon la chaîne aldéhyde glycolique, acide glycolique, acide glyoxylique, puis acide oxalique. Ces acides sont responsables d'une acidose métabolique, avec un trou anionique très élevé. Les symptômes neurologiques se développent en 24 heures. La demi-vie de l'éthylène glycol est courte (deux ou trois heures). On retrouvera donc peu de ce composé après l'ingestion. Inversement, une concentration importante de glycolate et d'oxalate est retrouvée dans la circulation. Un collapsus cardiovasculaire peut se développer en douze heures chez le patient. On observe également une insuffisance rénale aiguë, avec une cristallurie d'oxalate de calcium. L'éthanol bloque le métabolisme de l'éthylène glycol en acide glycolique.

■ *Paraldéhyde*

Intoxication très rare, métabolisée en acide acétique. Une acidose avec un trou anionique important se développe, facilement corrigée par l'administration de bicarbonates.

### d) Acidose lactique

L'acidose lactique, secondaire à une hypoxie ou à l'agression par des toxines (infection), est la conséquence d'un métabolisme anaérobie préférentiel du glucose. Il s'ensuit un déficit énergétique cellulaire (réduction de la formation d'ATP), conséquence d'un blocage du métabolisme oxydatif mitochondrial. L'augmentation de la production d'acides pyruvique et lactique, couplée avec la diminution de leur oxydation, contribue à leur accumulation. Un rapport lactate/pyruvate > 10 reflète l'état d'oxydation tissulaire et l'acidose lactique hypoxique.
L'acidose lactique peut être observée dans les grandes insuffisances hépatocellulaires et chez les diabétiques traités par les biguanides (inhibition de la néoglucogenèse hépatique), surtout lors de l'accumulation du médicament (insuffisance rénale, intoxication). Par ailleurs, chez les diabétiques non traités par les biguanides, une acidose lactique peut être vue lors des grandes acidocétoses (compensation pulmonaire insuffisante, hypoxie).
La correction de ces acidoses nécessite l'administration de doses d'alcalinisants importantes et la correction des désordres du métabolisme hydroélectrolytique.

## 3. Acidoses métaboliques sans modification du trou anionique

Ce sont des acidoses hyperchlorémiques (voir *fig.* 2).

### a) Acidoses métaboliques par pertes de bases

Les diarrhées aiguës et intenses et les fistules pancréatiques conduisent à une acidose métabolique. On observe dans tous les cas une déplétion potassique malgré l'état d'acidose métabolique (perte supérieure à la production). Par ailleurs, une aspiration duodénale ou des fistules digestives mènent à une acidose métabolique. Une situation particulière doit être signalée : les urétérosigmoïdostomies (abouchements des uretères au sigmoïde). Dans ce cas, une accumulation d'une urine riche en chlorure dans le sigmoïde provoque la réabsorption des chlorures (et de l'ammonium) en échange des bicarbonates évacués par les selles.

### b) Acidoses métaboliques d'origine rénale

- *Inhibiteurs de l'anhydrase carbonique* (acétazolamide) : ils provoquent une diminution de la réabsorption proximale des bicarbonates (fuite urinaire de bicarbonates, pH des urines alcalin). Au niveau de l'équilibre hydroélectrolytique, on observe une augmentation des chlorures.
- *Acidose tubulaire distale* (type 1) : impossibilité pour le tube distal d'établir un gradient de proton entre les cellules tubulaires et l'urine tubulaire. En découle une insuffisance de l'excrétion de l'acidité titrable. Les urines sont alcalines. Cette acidose est très commune dans les maladies osseuses et les néphrocalcinoses.
- *Acidose tubulaire proximale* (type 2) : l'anomalie consiste en une diminution de la capacité de la réabsorption des bicarbonates. Une déplétion potassique est fréquemment observée. Cette acidose peut être isolée ou entrer dans le cadre d'un syndrome de Fanconi (acidose proximale, diabète phosphaté, glycosurie sans hyperglycémie, aminoacidurie sans hyperaminoacidémie).
- *Diminution de la production d'ammonium* (type 4) : cette acidose s'accompagne d'une hyperkaliémie et d'une hyperchlorémie. Elle résulte de l'absence d'effets des minéralocorticoïdes sur le rein (aldostérone, rénine, angiotensine II), en

particulier chez les diabétiques et chez les patients atteints de néphrites interstitielles. Une insuffisance rénale modérée est présente dans la plupart des cas.

### c) Autres cas

- *Hydronéphrose* : déficit distal dans la sécrétion d'acide et du potassium.
- *Intoxications* : équivalent de l'acide chlorhydrique (chlorures d'ammonium, d'arginine, de lysine, de cholestyramine, ingestion orale de chlorure de calcium).
- *Toxicité des sulfures* métabolisés en acide sulfurique.

### d) Traitement

Le traitement est à la fois étiopathogénique et symptomatique. Le premier est toujours primordial, parfois le seul qui puisse permettre de maîtriser l'acidose (insuline pour les diabétiques, arrêts de la déperdition intestinale des bases). Le traitement symptomatique vise le rétablissement de l'équilibre par neutralisation des acides à l'aide de dérivés alcalins.
On utilise principalement le bicarbonate de sodium et le tris-hydroxyméthyl-aminométhane (THAM). Les bicarbonates sont les plus indiqués car directement utilisables, contrairement aux lactates qui doivent être dégradés en $CO_2$ (*via* l'acide pyruvique et l'acétate) et donc en bicarbonates. Les bicarbonates sont plus indiqués en perfusion dans les acidoses sévères. Les lactates ou les citrates, mieux tolérés *per os*, peuvent être indiqués dans les acidoses légères à titre préventif.
Le THAM, très efficace, pénètre dans les secteurs extra- et intracellulaire. Il est indiqué dans les acidoses sévères en perfusion. Son action immédiate peut entraîner une dépression respiratoire, annulant toute compensation respiratoire éventuelle. Le THAM est contre-indiqué dans les états d'équilibre circulatoire précaire (hypertension, insuffisance ventriculaire gauche), dans les défauts d'excrétion rénale du sodium (insuffisance cardiaque, néphrose, cirrhose, insuffisance rénale aiguë).
Les risques d'un traitement alcalin sont nombreux : crise de tétanie (passage de l'acidose à une alcalose, patient hypocalcémique), hypokaliémie (potassium réintégrant les cellules à la suite de la correction de l'acidose métabolique du diabétique). Les dépresseurs respiratoires sont évidemment proscrits.

## 4. Alcaloses métaboliques

### a) Définition

Les alcaloses métaboliques se définissent comme étant une accumulation de bicarbonates (ou de bases tampons) absolue ou relative par rapport au proton. Les valeurs plasmatiques sont alors supérieures à 26 mmol/L et le base excess positif. La compensation est une augmentation de la $pCO_2$ (hypercapnie) par hypoventilation. Cette compensation semblerait par ailleurs toute théorique si l'on tient compte des effets d'une augmentation de la $pCO_2$ sur la fréquence respiratoire. Ces alcaloses sont dues à l'un ou à plusieurs des processus suivants :

### b) Pathogénie

- Surproduction endogène de bicarbonates (métabolisme d'un excès de lactate ou d'acétoacétate) ou exogène (entrée excessive de bicarbonates).
- Perte excessive de protons (tube digestif, rein, cellules).

### c) Signes biologiques

- Élévation des bicarbonates (> 26 mmol/L) et des bases tampons plasmatiques (BE > + 2).
- Hypochlorémie constante, grossièrement proportionnelle à l'augmentation des bicarbonates.
- Hypokaliémie et hypocalcémie inconstante.
- Hypercapnie relative.

### d) Signes cliniques

- Troubles de la conscience (torpeur, coma).
- Troubles neuromusculaires (crampes, tétanie latente).
- Troubles respiratoires (respiration ralentie, superficielle).

### e) Étiologies

- Administration excessive d'alcalis : bicarbonate, lactate, citrate de sodium.
- Pertes excessives d'acides : perte de liquide gastrique, vomissements sévères, obstruction pylorique, fistules gastro-intestinales, aspiration nasogastrique excessive.
- Pertes rénales de protons, déplétion potassique, hyperaldostéronisme (augmentation de l'excrétion de l'ammonium).
- Pertes excessives de chlorures : gastro-intestinales (vomissements), abus de laxatifs, drainage, diarrhées avec perte de chlorures, diurétiques chloruriques.
- Excès minéralocorticoïdes : aldostéronisme primaire.
- Glucocorticoïdes à doses pharmacologiques.
- Production ectopique d'ACTH.
- Maladie de Cushing.
- Tumeurs sécrétantes de rénine.
- Hypertension rénovasculaire.
- Abus de réglisse : l'acide glycyrrhizinique possède une activité analogue à celle de l'aldostérone.
- Alcalose métabolique posthypercapnique : il s'agit d'une acidose ventilatoire chronique avec une hyperventilation aiguë sous respirateur.
- Autres : déplétion potassique sévère, syndrome de Bartter, hypercalcémie, carbenicilline, pénicilline G, fosfomycine.

### f) Traitement

Le traitement se fonde sur les mesures pratiques et théoriques suivantes :

- suppression des apports alcalins lorsqu'ils sont manifestement la cause de l'alcalose métabolique ;
- traitement de la cause des fuites digestives.

On remarquera que la neutralisation de l'excès de base est, d'une part, inutile, car le métabolisme normal fourni environ 50 à 80 mmoles de proton par jour, ce qui suffit amplement pour corriger l'alcalose en quelques jours et que, d'autre part, elle est insuffisante, parce qu'elle ne corrige pas le trouble fonctionnel rénal responsable de l'acidurie.

L'élément principal de la correction d'une alcalose métabolique est le rétablissement d'une fonction rénale normale pour obtenir l'excrétion de l'excès de base.

Parallèlement, on apportera du chlorure de potassium et du chlorure de sodium. Le recours à la dialyse peut être nécessaire.

## B. Troubles respiratoires

### 1. Acidoses respiratoires

#### a) Définitions

L'hypercapnie se définit comme étant une augmentation du $CO_2$ dans les liquides extracellulaires ($pCO_2$ supérieure à 45 mm de Hg). L'hypercapnie est la cause essentielle de l'acidose respiratoire. L'acidose respiratoire, conséquence de l'hypercapnie, est due à une hypoventilation. La compensation, si elle a lieu, consiste à augmenter la concentration des bicarbonates (et donc des bases tampons).
On n'oubliera pas que si le système pulmonaire est déficient pour éliminer le $CO_2$, il l'est tout autant pour fixer l'oxygène (diminution de la $pO_2$). En conséquence, on devra se souvenir qu'une acidose respiratoire peut s'accompagner d'une hypoxie tissulaire, facteur d'acidose métabolique (voir *plus haut*).

#### b) Pathogénie

L'acidose respiratoire peut être le résultat de cinq processus :
- obstruction des voies aériennes, apnée du sommeil ;
- diminution de la ventilation (respiration superficielle, lente) accident vasculaire cérébral, anesthésiques, morphiniques, tranquillisants, barbituriques, alcool, diminution des mouvements de la paroi thoracique (traumatismes, dystrophies musculaires, myasthénie, poliomyélite, curarisants) ;
- diminution des échanges gazeux entre les capillaires pulmonaires et les sacs alvéolaires des poumons (emphysème, bronchites, œdème pulmonaire, asthme, mucoviscidose) ;
- collapsus pulmonaire ;
- intoxication par le $CO_2$ (cas particulier).

#### c) Signes cliniques

Ces signes sont en relation avec l'hypercapnie et l'éventuelle hypoxémie :
- signes cardiovasculaires : essentiellement chute de la tension artérielle, tachycardie et collapsus ;
- signes neuropsychiques : céphalées, agitation, hallucination, torpeur et confusion mentale, coma ;
- signes cutanés : érythème cutané, sueurs profuses (hypercapnie), cyanose (hypoxémie).

#### d) Signes biologiques

Le seul signe biologique important est l'augmentation de la $pCO_2$. La chute du pH n'est en fait que la conséquence de cette augmentation (équation d'Henderson-Hasselbach).

À côté de cette augmentation de la $pCO_2$, on pourra observer, selon les circonstances :
- une augmentation des bicarbonates (excès de base positif) en cas de compensation totale (pH normal) ou partielle ;
- une hypochlorémie moins importante que l'augmentation des bicarbonates ;
- en théorie, une légère hyperkaliémie (toute acidémie tend à faire monter la concentration du potassium plasmatique) ;
- un pH urinaire bas, bicarbonates urinaires nuls.

### e) Traitements

Il s'agit de corriger l'hypercapnie et aussi l'hypoxémie :
- amélioration de la ventilation spontanée ou mise sous ventilation assistée temporaire si nécessaire ;
- les acidoses gazeuses des insuffisances respiratoires chroniques peuvent bénéficier :
  - des analeptiques respiratoires (caféine),
  - d'une antibiothérapie (infections pulmonaires),
  - d'oxygénothérapie à faible débit : en effet, le patient devenu insensible aux variations de la $pCO_2$, l'hypoxémie reste le seul stimulus respiratoire et l'inhalation d'un mélange trop riche en oxygène supprimerait ce stimulus. La conséquence serait une bradypnée, voire un arrêt respiratoire.
- les acidoses respiratoires d'origine nerveuse ou musculaire relèvent de l'assistance respiratoire mécanique. Les sédatifs dépresseurs respiratoires sont proscrits chez ces patients.

## 2. Alcaloses respiratoires

### a) Définitions

L'hypocapnie se définit comme étant une diminution du $CO_2$ dans les liquides extracellulaires ($pCO_2$ inférieure à 35 mm de Hg). L'hypocapnie est la cause essentielle de l'alcalose respiratoire. L'hypocapnie est due à une hyperventilation qui provoque, quand elle est profonde, une élimination du $CO_2$ supérieure à sa production.

### b) Étiologies

L'alcalose respiratoire, secondaire à une hyperventilation, peut quelquefois être due à l'abaissement primaire de la pression partielle en oxygène (hypoxémie). Les causes sont multiples :
- hyperventilation d'origine centrale, la $pO_2$ est élevée :
  - douleurs violentes, anxiété, hyperthermie majeure,
  - affections du système nerveux central (vasculaires, infectieuses, tumorales),
  - encéphalopathie hépatique,
  - intoxications aiguës (salicylates, CO voir *plus loin*),
  - hyperventilation volontaire ;
- hyperventilation d'origine hypoxique :
  - $pO_2$ diminuée, ces cas sont complexes et souvent transitoires : asthme, pneumopathies aiguës, œdèmes aigus pulmonaires, embolies pulmonaires, trauma-

tismes thoraciques, pleurésies, pneumothorax, laryngites, cardiopathie avec shunt droit-gauche,
– plus simple, séjour en haute altitude (raréfaction de l'oxygène),
– paradoxalement, le $pO_2$ est augmenté : choc cardiogénique, choc hémorragique ou hypovolémique, choc septique, choc allergique et anaphylactique.

En effet, dans le cas d'hyperventilation d'origine hypoxique, on doit distinguer deux cas, par l'étude de la $pO_2$ et de la $SaO_2$ :
- le cas le plus fréquent est dit « anoxémique ». Il est la conséquence d'un séjour en atmosphère raréfiée ou bien d'une lésion pulmonaire responsable d'une diminution des échanges pulmonaires. Dans ces deux cas, la pression partielle en oxygène des liquides extracellulaires est très diminuée ;
- le deuxième cas est dit « anémique ». Il s'agit de la diminution du pouvoir de transport (oxyphorique) de l'hémoglobine, secondaire à une anémie ou à une saturation de l'hémoglobine par un toxique (monoxyde de carbone, CO). Dans ces cas, la $pO_2$ peut être augmentée par le traitement (mélange enrichi en $O_2$, caisson hyperbare) ;
- un autre cas est représenté par la méthémoglobinémie qui peut conduire à une hypoxie cellulaire.

### c) Signes cliniques

L'*hyperventilation alvéolaire* : elle peut être évidente, commune à toutes les étiologies, correspondant à un rythme rapide, mais quelquefois à un rythme normal, voire lent, mais avec augmentation de l'amplitude. On peut observer une *irritabilité*, des *crises de tétanie* (pH augmenté et calcium ionisé abaissé) ou des *convulsions*, souvent entretenues par une hyperpnée volontaire. L'*alcalose ventilatoire*, caractéristique du mal des montagnes et des séjours en haute altitude, est la conséquence de la faible pression partielle de l'oxygène de l'atmosphère en haute altitude, cause de l'hypoxémie relative (ou de la dette en oxygène en cas d'exercice physique) impliquant une hyperpnée.

### d) Signes biologiques

- Le seul signe biologique important est une diminution de la $pCO_2$, l'augmentation du pH n'étant que la conséquence de cette diminution (équation d'Henderson-Hasselbach). Cette augmentation peut atteindre des valeurs supérieures à 7,50.
- À côté de ces éléments de premier ordre, on peut observer une diminution des bicarbonates en fonction d'une éventuelle compensation, associée à une hyperchlorémie moins marquée. On pourra également observer une hypokaliémie légère (toute alcalose entraîne une hypokaliémie). Le calcium ionisé est diminué, ce qui explique l'apparition de crises de tétanie, alors que le calcium total est normal.
- Si la compensation physiologique est efficace, on observera un pH normal (l'alcalémie a disparu, mais pas l'alcalose), une concentration en bicarbonates normale, bicarbonates qui sont remplacés par une augmentation des chlorures (diagramme de Gamble).
- Au niveau urinaire, le pH et les bicarbonates sont élevés, l'excrétion de l'ion ammonium et des chlorures est réduite.

### e) Traitements

Comme nous l'avons vu précédemment, la détermination de la $pO_2$ est essentielle. Deux cas sont à envisager selon ses valeurs :

- $PO_2$ élevée : les hyperventilations primitives d'origine centrale peuvent être traitées, sous contrôle d'un médecin réanimateur, par des dépresseurs respiratoires. Sans hypoxie, lors d'hyperventilation aiguë avec tétanie, on peut pratiquer un recyclage de l'air exhalé dans un sac maintenu devant le nez ou la bouche. Un moyen simple de faire respirer un mélange légèrement enrichi en $CO_2$, qui permet de normaliser le pH et de faire disparaître les signes de tétanie, tout en surveillant l'oxygénation tissulaire (absence de cyanose) ;
- $PO_2$ abaissée : les hyperventilations secondaires à une hypoxémie peuvent être traitées par l'oxygénothérapie large, surtout dans les shunts ventilocirculatoires avec hypoxémie majeure. Les autres étiologies seront traitées par des mesures adaptées : désobstruction, antibiothérapie, transfusion.

## C. Troubles mixtes

Un syndrome mixte se définit par coexistence de deux ou plusieurs perturbations élémentaires. Du point de vue de leurs effets sur le pH, ils peuvent être additifs ou s'annuler. Ils sont difficiles à détecter et reflètent des troubles sévères d'interprétation physiopathologique complexe. Ici plus qu'ailleurs, les signes cliniques et l'histoire du patient doivent nous guider :

- le pH est normal, mais :
  - les bicarbonates sont élevés : alcalose métabolique et acidose respiratoire,
  - les bicarbonates sont bas : acidose métabolique et alcalose respiratoire,
  - les bicarbonates sont normaux et le trou anionique est élevé : acidose métabolique et alcalose métabolique ;
- le pH est très haut ou très bas, la $pCO_2$ et les bicarbonates varient en sens contraire. Dans ce cas, nous sommes en présence d'une alcalose mixte ou d'une acidose mixte.

### 1. Alcaloses mixtes

#### a) Définitions

Les alcaloses mixtes combinent les effets des alcaloses métaboliques et des alcaloses respiratoires. Elles se définissent par une élévation de la concentration des bicarbonates (ou des bases tampons) et par une diminution de la $pCO_2$ (alcalose respiratoire). La conséquence biologique immédiate est une forte augmentation du pH des liquides extracellulaires. C'est en fait l'association des deux perturbations (modérées par elles-mêmes) qui entraîne cette forte augmentation. Physiologiquement, c'est une situation grave.

#### b) Étiologie

- Une alcalose ventilatoire primaire se transforme en alcalose mixte :
  - administration erronée de bicarbonates,
  - au cours d'une anémie sévère, avec polypnée, avec vomissements ou aspiration gastrique (soustraction d'acide). Ces cas peuvent survenir au cours de complications des hémorragies digestives, cirrhotiques, néoplasiques ;

- L'alcalose métabolique primaire se transforme en alcalose mixte :
  - agression alcaline en atmosphère raréfiée,
  - cirrhose décompensée associant une hyperventilation liée à une hypoxie (anastomoses portopulmonaires) et une acidose métabolique.

### c) Traitement

La correction de l'hypocapnie (et ainsi de l'hypoxie) prime sur la correction de l'acidose métabolique. En urgence, on pratiquera donc une oxygénothérapie et, selon le cas, une transfusion. L'usage de dépresseurs respiratoires ne peut se faire qu'en milieu hospitalier dans les services de réanimation. Les comas barbituriques sont traités par hyperventilation assistée et surcharge bicarbonatée (l'alcalose mixte favorise la diffusion du barbiturique hors des cellules).

## 2. Acidoses mixtes

### a) Définitions

Les acidoses mixtes combinent les effets des acidoses métaboliques et des acidoses respiratoires. Elles se définissent par une diminution de la concentration des bicarbonates (ou des bases tampons) et de l'augmentation de la $pCO_2$ (alcalose respiratoire). La conséquence biologique immédiate est une forte diminution du pH des liquides extracellulaires. Ici aussi, c'est l'association des deux perturbations (modérées par elles-mêmes) qui entraîne cette forte diminution, souvent inférieure à 7,20. Cette association est une situation physiologiquement grave.
Les autres anomalies sont en rapport avec l'acidose. L'hyperkaliémie est fréquente et complique le trouble respiratoire par son retentissement sur le muscle thoracique. La transformation d'une acidose métabolique ou gazeuse, jusque-là bien tolérée, se décompense brutalement, avec chute du pH, conduisant au collapsus cardiovasculaire.

### b) Étiologies

- Acidose métabolique primaire (diabète, insuffisance rénale aiguë ou chronique) se transformant en acidose mixte. Normalement en partie compensée par l'hypocapnie, si une perturbation ventilatoire survient (encombrements bronchiques, paralysie respiratoire), la $pCO_2$ s'élève et le pH chute fortement.
- Acidose gazeuse primaire se transformant en acidose mixte. Le cas peut se présenter chez un patient soufrant d'insuffisance respiratoire aiguë ou chronique et présentant un épisode d'insuffisance rénale ou un collapsus dont l'acidose est un facteur d'irréversibilité.

### c) Traitements

- L'acidose mixte nécessite un traitement d'urgence.
- THAM en perfusion ou, si l'acidose métabolique est prépondérante, administration de bicarbonates en perfusion.
- Amélioration de la ventilation pulmonaire par assistance respiratoire.

# Conclusion

Le diagnostic correct des perturbations de l'équilibre acide-base comprend l'analyse et la synthèse de toutes les informations provenant de l'histoire du patient, de son examen clinique et des résultats du laboratoire. Vouloir utiliser l'un ou l'autre de ces éléments séparément est insuffisant et dangereux pour l'établissement du diagnostic et la mise en place d'une thérapeutique :

- à partir de son histoire :
  - des considérations purement cliniques sont impliquées dans les perturbations de l'équilibre acide-base. Ces considérations permettent de prévoir le trouble primaire et son origine. Des problèmes de ventilation pulmonaire ou d'aspiration nasogastrique laissent prévoir des perturbations de l'équilibre,
  - chez un insuffisant rénal ou chez un diabétique, on peut prévoir une acidose métabolique. Une pneumonie, une maladie infectieuse, une insuffisance hépatique peuvent faire prévoir une alcalose respiratoire. Une thérapeutique par certains diurétiques peut conduire à une alcalose métabolique. Dans certains tableaux cliniques graves (arrêt cardiaque, choc septique, diverses intoxications), on observe de sérieux désordres mixtes de l'équilibre acide-base ;
- à partir de l'examen clinique :
  - une tétanie avec un calcium normal est compatible avec une alcalose sévère,
  - une cyanose nous indique une hypoxie pouvant être associée avec une acidose respiratoire et une acidose lactique,
  - une respiration profonde et/ou rapide, en l'absence d'insuffisance cardiaque ou pulmonaire, est compatible avec une hyperventilation associée à une acidose métabolique sévère (diabète acidocétosique),
  - l'alcalose métabolique est habituelle chez les patients présentant des signes de contraction du volume des liquides extracellulaires, alors qu'une fièvre élevée déclenche une alcalose respiratoire typique ;
- à partir des examens du laboratoire :
  - la mesure des gaz du sang et la détermination du pH se font toujours sur prélèvement artériel (ou éventuellement sur capillaire, mais les valeurs usuelles diffèrent légèrement),
  - l'examen des électrolytes fait partie intégrante de l'étude de l'équilibre acide-base,
  - au laboratoire, l'examen inclut souvent la détermination du $CO_2$ total. Il s'agit de la somme des bicarbonates, de l'acide carbonique et du $CO_2$ dissous,
  - une variation de la $pCO_2$ indique un trouble (ou une adaptation) d'origine pulmonaire,
  - une variation des bicarbonates ou des bases tampons indique un trouble (ou une adaptation) d'origine métabolique,
  - si les bicarbonates sont inférieurs à 12 mmol/L, les possibilités de compensation d'une alcalose respiratoire sont dépassées, alors l'acidose métabolique est définitivement présente. Inversement, si les bicarbonates sont supérieurs à 45 mmol/L, les possibilités de compensation d'une acidose respiratoire sont dépassées. Dans ce cas, l'alcalose métabolique peut être facilement diagnostiquée,

– savoir interpréter les changements des concentrations plasmatiques des chlorures. Toutefois, ces changements ne seront intéressants que si leurs variations sont sans rapports avec celles du sodium. Dans ces conditions, une baisse significative des chlorures (avec une augmentation des bicarbonates) est en relation avec une alcalose métabolique (ou une adaptation à une acidose respiratoire chronique). À l'inverse, une augmentation des chlorures plasmatiques, avec une diminution des bicarbonates et le signe d'une acidose métabolique primaire (avec trou anionique normal) et d'une adaptation à une alcalose respiratoire chronique,
– en général, les changements de la kaliémie sont utiles comme indicateur qualitatif des perturbations de l'équilibre acide-base. Un potassium élevé, associé à une concentration en bicarbonates basse, est le témoin d'une acidose métabolique. Inversement, un potassium plasmatique bas, associé à des bicarbonates augmentés, est le témoin d'une alcalose métabolique.

## L'essentiel de la question

*Équilibre acide-base* : description quantitative du pH et des facteurs déterminant le pH.
*pH* : logarithme de l'inverse de la concentration en ions $H^+$ (valeurs usuelles : 7,40 ± 0,05).
*[$H^+$]* : concentration en ion hydrogène, donnée en nanomoles/litre (valeurs usuelles : 35 à 45 nmol/L).
*$pCO_2$* : pression partielle en $CO_2$ donnée en mm de Hg, directement reliée à la concentration en $CO_2$. L'unité internationale est le kPascal : $pCO_2$ = 40 mm de Hg, soit 5,3 kPa. Composante respiratoire de l'équilibre acide-base.
*Acidémie et alcalémie* : ces termes se réfèrent à la concentration du proton dans le sang. Elle est soit élevée (acidémie), soit basse (alcalémie).
Les troubles respiratoires sont ceux dont la cause est pulmonaire [élimination anormale du $CO_2$ conduisant à un excès (acidose) ou à un déficit (alcalose) de l'acide carbonique dans les tissus extracellulaires].
*Acidose respiratoire* : processus pathologique primaire d'hypoventilation alvéolaire caractérisée par une $pCO_2$ > 40 mm de Hg et un pH < 7,40.
*Alcalose respiratoire* : processus pathologique primaire d'hyperventilation alvéolaire caractérisée par une $pCO_2$ < 40 mm de Hg et un pH > 7,40.
Les troubles métaboliques sont ceux dont la cause est une entrée excessive, une production métabolique ou une perte excessive d'acides fixes ou de bases dans les liquides extracellulaires.
*Composante métabolique de l'équilibre acide-base* : tout composant de l'équilibre acide-base non respiratoire, c'est-à-dire tout facteur hormis la $pCO_2$, qui influence le pH.
*Excès de base ou base excess (BE)* : paramètre calculé permettant l'étude de la composante métabolique de l'équilibre acide-base pour un $pCO_2$ théorique de 40 mm de Hg, à 37 °C et à la saturation actuelle en oxygène. Si le BE est négatif, c'est-à-dire en cas d'acidose métabolique, on préfère utiliser le terme de « déficit de base » (BD). BE et BD sont exprimés en mmol/L.
*Acidose métabolique* : processus primaire avec excès de base négatif (diminution des bicarbonates) qui conduit à une chute du pH.

*Alcalose métabolique* : processus primaire avec excès de base positif (augmentation des bicarbonates) qui conduit à une augmentation du pH.
*Bases tampons (BB)* : exprimées en mmol/L, paramètre de composante métabolique de l'équilibre acide-base, utile dans les comparaisons des bilans acide-base et électrolytiques. S'il n'y a pas de troubles métaboliques, les BB sont égales à 41 mmol/L pour une concentration protéique de 72 g/L. Les bases tampons sont augmentées dans les alcaloses métaboliques et abaissées dans l'acidose métabolique.

*Compensations respiratoires* : pour un trouble d'origine métabolique, les compensations ont lieu comme suit :
- compensation d'une acidose métabolique : réduction de la $pCO_2$ ;
- compensation d'une alcalose métabolique : augmentation de la $pCO_2$.

*Compensations métaboliques* : pour un trouble d'origine respiratoire, les compensations ont lieu comme suit :
- compensation de l'acidose respiratoire : essentiellement accroissement des bicarbonates ;
- compensation de l'alcalose respiratoire : essentiellement réduction des bicarbonates.

**Tableau 5.** Classification des désordres acide-base

| Désordre | pH | $pCO_2$ | $HCO_3^-$ | Base excess | Compensation |
|---|---|---|---|---|---|
| Acidose métabolique | ↓ | N | ↓ | ↓ | ↓ $pCO_2$ |
| Acidose respiratoire | ↓ | ↑ | N | N | ↑ $HCO_3^-$ |
| Alcalose métabolique | ↑ | N | ↑ | ↑ | ↑ $pCO_2$ |
| Alcalose respiratoire | ↑ | ↓ | N | N | ↓ $HCO_3^-$ |

N : initialement normal.

**Tableau 6.** Causes fréquentes de perturbations de l'équilibre acide-base

| Désordres | pH | $pCO_2$ | $pO_2$ | $HCO_3^-$ | BE | TA | $SaO_2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Détresse respiratoire | ↓ | ↑ | ↓ | N | N | N | ↓ |
| Acidose lactique | ↓ | N* | N | ↑ | ↓ | ↑ | ↓ |
| Cétose diabétique | ↓ | N* | N | ↑ | ↓ | ↑ | ↓ |
| Emphysème | ↓ | ↑ | ↓ | N | N | N | ↓ |
| Méthanol | ↓ | N* | N | ↑ | ↓ | ↑ | ↓ |
| Insuffisance rénale | ↓ | N* | N | ↑ | ↓ | ↑ | ↓ |

* Initialement normal.

### *Pour en savoir plus*


- Davenport H. W. *ABC de l'équilibre biochimique de l'équilibre acidobasique*. Paris, Masson.
- Valdiguié P. *Biochimie clinique*. Cachan, Édition médicale internationale.
- Précis de biochimie de Harper. Issy-les-Moulineaux, De Boeck Université.

# Le métabolisme hydroélectrolytique et ses perturbations
# Les ions sodium, chlorure et potassium

P. DERACHE, M.-C. DELMAS-BEAUVIEUX, M. DARMON
Université Victor-Segalen, Bordeaux-II.

## VI. Ion sodium

**A.** Entrées
**B.** Sorties
**C.** Régulation
**D.** Hyponatrémie
**E.** Causes des hyponatrémies hypo-osmolaires
**F.** Hypernatrémie
**G.** Causes des hypernatrémies

## VII. Ion chlorure

**A.** Répartition
**B.** Entrées
**C.** Sorties
**D.** Hyperchlorémies
**E.** Hypochlorémies

## VIII. Ion potassium

**A.** Répartition
**B.** Entrées
**C.** Sorties
**D.** Pathologies

*Les ions sodium, chlorure et potassium visent seulement à assurer une meilleure compréhension des mécanismes présidant aux désordres hydroélectrolytiques. La rédaction d'une question peut se contenter d'un résumé.*

# I. Rappels généraux

On peut très schématiquement diviser l'organisme en deux grands secteurs : l'intracellulaire et l'extracellulaire. L'organisme tend à maintenir constante la composition de son milieu intracellulaire et celle des espaces extracellulaires. Ces deux secteurs sont en équilibre par le maintien constant de la composition de chacun d'eux. Il doit y avoir équilibre entre les entrées intestinales en eau et électrolytes et les sorties, représentées par les urines, selles, sueur, etc. Bien que les apports alimentaires en eau et électrolytes soient très variables, les compositions qualitatives et quantitatives en solutés demeurent constantes même si très différentes entre le milieu extracellulaire (par exemple : Na #140 mmol/L, K #4 mmol/L) et le milieu intracellulaire (par exemple : Na #10 mmol/L, K #150 mmol/L). L'organisme possède donc des transports d'électrolytes très efficaces.
Les espaces extracellulaires exercent une protection du milieu intracellulaire et se comportent comme un tampon capable de modifier leur composition pour maintenir celle du milieu intracellulaire inchangée le plus longtemps possible. La régulation de cette composition est assurée par des grands systèmes endocriniens et neuroendocriniens.
Exemples :

- contrôle du volume par la régulation des entrées et sorties d'eau mettant en jeu la soif ou l'action de l'arginine vasopressine (AVP, anciennement hormone antidiurétique ADH) ;
- contrôle de la natriurèse sur un critère de pression sanguine glomérulaire grâce au système rénine-angiotensine-aldostérone ou le facteur natriurétique auriculaire.

Il est vital pour la cellule de maintenir son volume et sa composition en eau et électrolytes constants : c'est l'homéostasie du milieu intracellulaire. Les concentrations en $H^+$, $K^+$ et $Ca^{2+}$ contrôlent en effet fortement l'activité de nombreuses enzymes ainsi que les propriétés bioélectriques des membranes excitables (muscles, neurones).
La membrane cellulaire ayant une perméabilité sélective, la cellule se comporte comme un osmomètre : tous les solutés (dont les électrolytes) ont tendance à se déplacer passivement du milieu le plus concentré vers le milieu le moins concentré. Les mouvements de l'eau se font passivement du milieu le moins concentré vers le milieu le plus concentré. Les mouvements d'eau ont pour effet de maintenir la pression osmotique intracellulaire constante. Ainsi le $Na^+$ extracellulaire tend à gagner le milieu intracellulaire (pauvre en $Na^+$) et le $K^+$ intracellulaire tend à sortir de la cellule vers le milieu extracellulaire pauvre en $K^+$ (*fig. 1*).
*Note* : le déplacement se fait du milieu ayant le potentiel chimique ($\mu$ = RTlog[C]) le plus élevé vers celui ayant le plus faible. Pour les solutés, du milieu le plus concentré ($\mu$[solutés] le plus élevé) vers le milieu le moins concentré ($\mu$[solutés] le plus faible). Pour l'eau, du milieu le moins concentré ($\mu[H_2O]$ le plus élevé) vers le milieu le plus concentré ($\mu[H_2O]$ le plus faible).

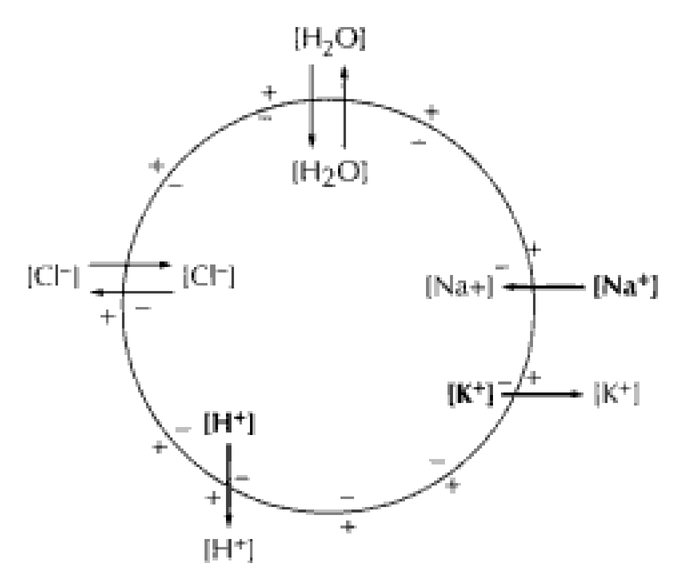


**Figure 1.** Flux passif à pression osmotique identique

Sachant que la cellule doit maintenir une forte concentration de $K^+$ intracellulaire et une faible concentration de $Na^+$ intracellulaire, il faut un mécanisme de compensation actif représenté par l'enzyme $Na^+$-$K^+$-ATPase, « pompe » membranaire que l'on trouve dans toutes les cellules. La pompe Na-K-ATPase fait sortir de la cellule 3 $Na^+$ et y fait entrer 2 $K^+$ (stœchiométrie précise) (*fig. 2*).

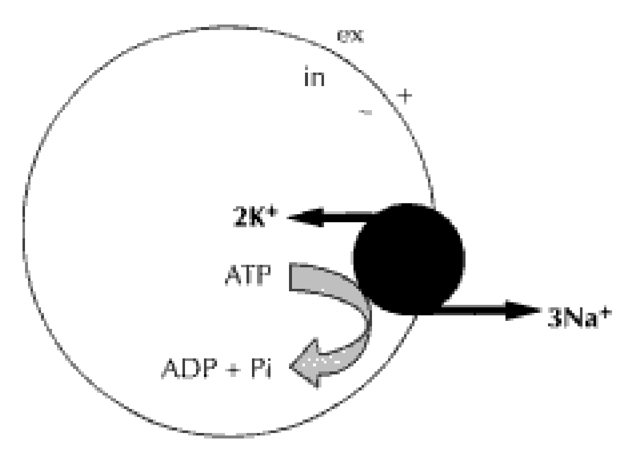


**Figure 2.** Pompe Na-K-ATPase électrogénique

En fait, les électrolytes étant chargés et la membrane étant polarisée, on doit aussi considérer le gradient électrochimique qui tient compte à la fois du gradient de concentration et du gradient électrique ($\mu = E + RT \log[C]$). En résumé, en termes de concentration, la molécule tend à se déplacer passivement du moins concentré vers le plus concentré. En termes de charge électrique, un composé positif se déplace du + vers le – et un composé négatif se déplace du – vers le +. L'équilibre entre ces deux gradients et le mouvement net de l'électrolyte dépendront de l'importance relative des deux gradients.

La connaissance de ces mécanismes de régulation des mouvements permet de comprendre la séquence des événements lors de déséquilibres hydroélectrolytiques.

Ainsi, il faut garder en mémoire que le milieu extracellulaire, système de « protection », est toujours touché en premier. Dans le cas d'une diminution initiale de

$H_2O$ extracellulaire, la concentration $Na^+$ *ex* augmente. $Na^+$ aurait tendance à entrer dans la cellule (selon son gradient de concentration) et $H_2O$ intracellulaire aurait tendance à sortir (elle va du moins concentrer vers le plus concentré). Mais grâce à la pompe $Na^+$-$K^+$-ATPase qui va être stimulée pour faire ressortir $Na^+$, $H_2O$ *in* sera préservée. Le traitement le plus simple est de pallier l'anomalie initiale : apporter de l'eau qui recharge le milieu extracellulaire.
Le métabolisme de l'eau et le métabolisme des ions sodium, potassium et chlorures sont très intimement liés. Des perturbations de l'un entraînent des perturbations de l'autre. De plus, les perturbations du métabolisme des ions dominent les perturbations du métabolisme de l'eau. En d'autres termes, la régulation des concentrations ioniques l'emporte sur celle des volumes des différents secteurs.

## A. Métabolisme de l'eau

L'eau représente environ 70 % de la masse corporelle chez l'adulte, ce qui correspond environ à 50 litres d'eau pour un sujet de 70 kg. Chez l'homme, la masse d'eau totale représente de 60 à 70 %, chez la femme de 50 à 60 %. La répartition de l'eau est très inégale dans l'organisme, elle varie en fonction des tissus, mais aussi en fonction des organes. Les tissus les plus riches en eau sont le cerveau, le muscle, la peau et le sang. Son rôle est multiple :
- solvant pour le transport de nombreuses substances (eau libre ou circulante) ;
- produit du métabolisme intermédiaire ;
- eau liée ou de constitution des macromolécules et de colloïdes. Dans ce cas, elle n'est pas échangeable ;
- les réactions enzymatiques utilisent et produisent de l'eau.

L'étude et la compréhension des échanges d'eau sont plus faciles à comprendre si l'on considère sa répartition en secteurs. Il s'agit beaucoup plus d'entités physico-chimiques qu'anatomiques. La composition de ces secteurs est liée à leur tonicité – en d'autres termes, à leur pression osmotique. Cette dernière s'évalue en termes d'osmolalité. L'osmolalité, adoptée par le système international, définit la concentration totale des composés osmotiquement actifs. Elle s'exprime en milliOsmoles par kilogramme d'eau (mOsm/kg). L'osmolalité efficace tient compte de corrections dues à la diffusion libre de l'urée ou variable du glucose [osmolalité efficace = $2(Na^+ + K^+)$ + glycémie].

## B. Eau totale

Il s'agit de l'eau contenue dans l'organisme entier, soit 60 à 70 % de la masse corporelle. Ces chiffres peuvent varier de 50 à 75 % au cours de pathologies diverses :
- plus élevés chez l'enfant : 75 % ;
- plus élevés chez le nourrisson : 80 à 85 % ;
- plus faible chez le vieillard ;
- plus faible chez l'obèse.

Classiquement, on répartit l'eau totale en deux secteurs : l'extracellulaire et l'intracellulaire.

## C. Eau extracellulaire

Il s'agit de l'eau qui baigne les cellules et les matrices extracellulaires :
- les liquides interstitiels ;
- le plasma ;
- le liquide céphalorachidien.

Les liquides de la plèvre, du péricarde et du péritoine ont un volume virtuel à l'état normal. L'eau extracellulaire représente de 20 à 25 % de la masse corporelle, soit environ 40 % de l'eau totale. Cette eau se caractérise par sa richesse en sodium, chlorures et bicarbonates.

### 1. Plasma

Il s'agit de l'eau contenue dans le secteur vasculaire, en dehors de l'eau des éléments figurés du sang. Elle représente 4 à 5 % de la masse corporelle chez l'adulte. Son volume est assez constant et étroitement régulé. En additionnant les volumes globulaire et plasmatique, on obtient la volémie. Celle-ci est contrôlée de façon très précise. Le *plasma a une composition caractéristique* (*tab. 1*) :

**Tableau 1.** Composition électrolytique du plasma

| Cations | | Anions | |
|---|---|---|---|
| Sodium | 134 à 142 mmol/L | Chlorures | 95 à 105 mmol/L |
| Potassium | 3,5 à 4,5 mmol/L | Bicarbonates | 22 à 26 mmol/L |
| Calcium | 2,25 à 2,62 mmol/L | Acides organiques | 2,6 à 6,0 mmol/L |
| Magnésium | 0,66 à 0,95 mmol/L | Protéines* | 14 à 18 mmol/L |
| | | Phosphates | 0,95 à 1,25 mmol/L |
| | | Sulfates | 0,43 à 1,10 mmol/L |

* Les protéines plasmatiques (62 à 80 g/L) sont considérées dans leur globalité comme anions pour un pH de 7,4.

En faisant la somme cations plus anions, on obtient une osmolalité de 295 à 310 mmol/L, surtout liée au sodium. Par approximation, on peut dire que :

$$\text{Pression osmotique due aux ions} = (Na_{mmol/L} + 10) \times 2$$

### 2. Liquides interstitiels

Cette eau est en contact direct avec les cellules. On peut la calculer par différence entre l'eau extracellulaire et l'eau plasmatique. Elle comprend :
- les liquides intercellulaires ;
- les liquides des matrices extracellulaires et des tissus de soutien : os, cartilage (non échangeable), derme (échangeable) ;
- la lymphe.

Elle correspond à environ 16 % de la masse corporelle. Sa composition est voisine de celle du plasma, à l'exception de la faible teneur en protéines (3 à 8 g/L) (*tab.* 2). Les taux plus élevés de chlorures et de bicarbonates permettent de respecter l'équilibre de Donnan. Les troubles de la répartition des liquides interstitiels (formation ou résorption) conduisent à la formation d'œdèmes. Le rôle de la membrane de l'endothélium capillaire est important dans l'élaboration du liquide interstitiel et donc de l'apport nutritionnel aux cellules.

**Tableau 2.** Composition du milieu interstitiel

| | |
|---|---|
| Protéines | 3 à 8 g/L (0,7 à 1,8 mmol/L) |
| Sodium | 132 mmol/L |
| Chlorures | 110 mmol/L |
| Bicarbonates | 30 mmol/L |

### 3. Liquides transcellulaires

Ces liquides transitent à travers certains tissus et remplissent des espaces bien déterminés. Il s'agit de :

- liquide céphalorachidien ;
- liquide synovial ;
- liquides de l'œil ;
- sécrétions digestives ;
- plèvre, péricarde, péritoine.

Ce secteur représente 1 à 3 % de la masse corporelle et est à l'origine de la formation des liquides d'ascite, pleuraux et péricardiques.

## D. Eau intracellulaire

Cette eau représente la différence entre l'eau totale et l'eau extracellulaire et correspond à 30 à 50 % de la masse corporelle – sa détermination est difficile. Sa composition est résumée dans le *tableau 3*.

**Tableau 3.** Composition du milieu intracellulaire

| Cations | | Anions | |
|---|---|---|---|
| Potassium | 100 à 150 mmol/L | Phosphates | 60 à 80 mmol/L |
| Magnésium | 15 à 25 mmol/L | Protéines | 40 mmol/L |
| Sodium | 5 à 15 mmol/L | Sulfates | 2 à 5 mmol/L |
| Calcium | 1 à 2 mmol/L | Acides organiques | 20 mmol/L |
| | | Bicarbonates | 5 à 20 mmol/L |
| | | Chlorures | 10 mmol/L (sauf érythrocytes) |

# II. Mouvements de l'eau

## A. Bilan des entrées et des sorties

Ces mouvements sont liés principalement aux mouvements des électrolytes. Le bilan hydrique est évalué par les entrées et les sorties. Ce bilan des entrées et des sorties doit être équilibré. La *figure 3* présente les mouvements de l'eau dans l'organisme. Chez l'adulte, les apports quotidiens d'eau sont de l'ordre de 30 à 35 ml/kg. Chez le nourrisson, les entrées devront être plus importantes puisqu'il perd plus de 14 % de son eau totale par jour. Chez celui-ci, les apports quotidiens sont fixés à 150 ml/kg avant un an. Chez l'enfant de plus d'un an, les apports quotidiens sont de l'ordre de 100 ml/kg.

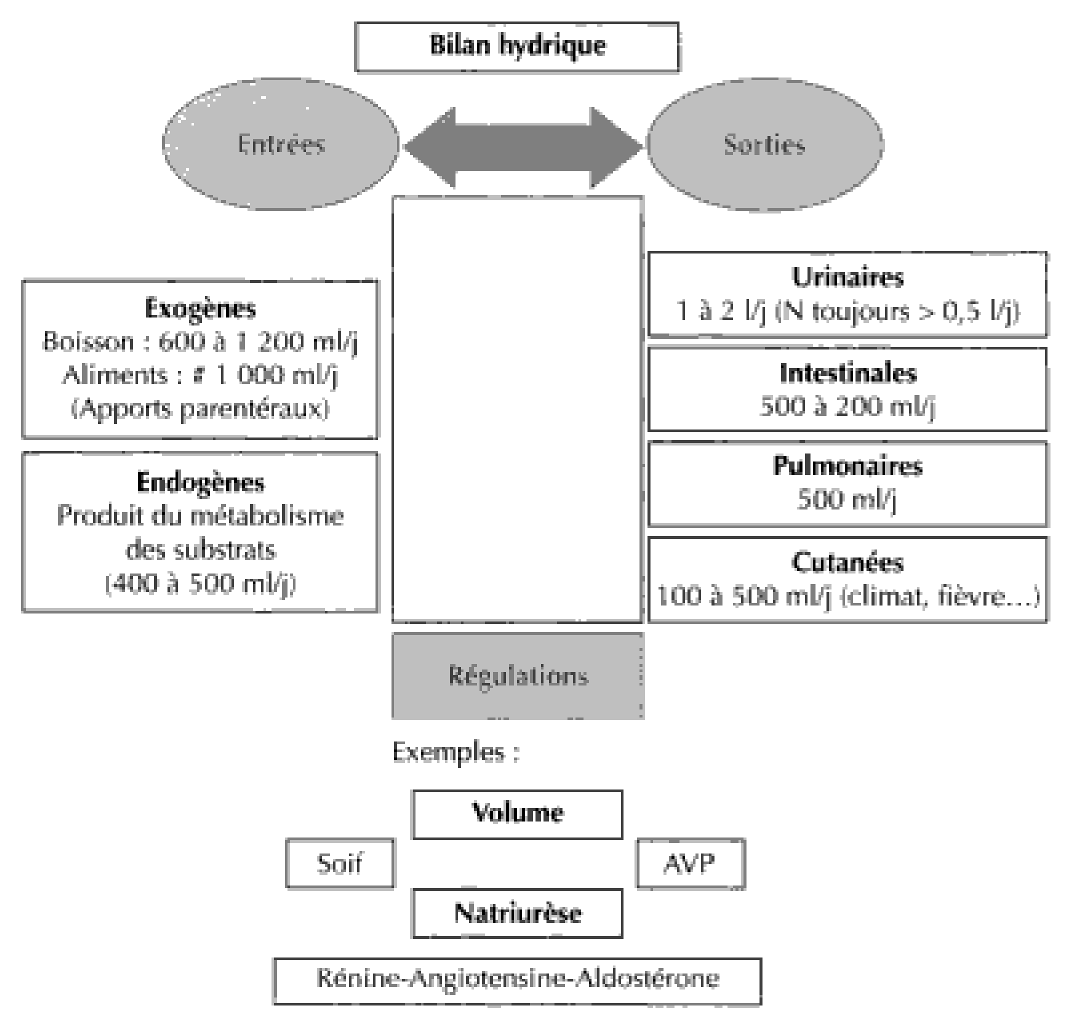



**Figure 3.** Mouvements de l'eau

## B. Mécanismes de régulation

Plusieurs mécanismes de régulation sont mis en jeu :
- soif ;
- régulation rénale ;
- AVP et diverses actions hormonales ;
- récepteurs.

# III. Méthodes d'exploration

## A. Mesure directe des compartiments hydriques

Ces mesures, résumées dans le *tableau* 4, sont lourdes à mettre en œuvre (sauf en ce qui concerne l'hématocrite) et, de fait, elles ne sont pas pratiquées en routine.

**Tableau 4.** Mesure des compartiments hydriques

| Compartiment | Méthodologie | Caractéristiques |
|---|---|---|
| Volume plasmatique (1) | Distribution de l'albumine 131 L, du bleu Evans, du Dextran® Hématocrite | Pratique courante |
| Volume sanguin (2) | Distribution érythrocytaire du 51Cr | |
| Secteur extracellulaire (3) | Sulfocyanure de Na Mannitol, Inuline | Sous-estimation Élimination rénale rapide |
| Eau totale (4) | Eau deutériée ou tritiée Antipyrine, 131I | |

Calcul du volume globulaire total = (2), hématocrite
Liquide interstitiel = (3), (1)
Liquide intracellulaire = (4), (3)

## B. Méthodes courantes indirectes

Plus accessibles que les précédentes, ces méthodes simples permettent une approche sérieuse du problème.

### 1. Méthode globale

- Surveillance du poids, indispensable chez le nourrisson et en réanimation.
- Aspect de la peau et des muqueuses.
- Bilan des entrées (y compris les perfusions) et des sorties (diurèse, pertes sanguines par divers prélèvements).

### 2. Secteur plasmatique

- Numération globulaire.
- Dosage de l'hémoglobine.
- Hématocrite.
- Dosage des protéines plasmatiques.
- Osmolalité, évaluée à partir du sodium.

Les trois premiers paramètres permettent de définir une hémoconcentration ou une hémodilution. L'association du dosage des protéines totales plasmatiques permet de vérifier que, en l'absence de perturbations d'origine hématologique ou de perturbation de la biosynthèse des protéines, les troubles observés sont bien dus à un trouble de l'hydratation. L'étude de l'osmolalité permet de trancher.

### 3. Secteur urinaire

- Diurèse.
- Osmolalité urinaire.
- Densité urinaire.
- Détermination de l'urée, du sodium et du potassium.

## C. Détermination de la clairance de l'eau libre

Cette épreuve permet l'exploration des mécanismes neurohormonaux du métabolisme de l'eau.

*Définition* : l'osmolarité du plasma est pratiquement constante (300 mOsm/L), soit une osmolalité de 297 mOsm/kg si on veut l'exprimer en mOsm par kg de solvant, c'est-à-dire l'eau. La molalité osmotique de l'urine varie de 100 à 1 200 mOsm/L. L'eau libre est celle qu'il faut ajouter ou retrancher pour avoir une urine iso-osmotique au plasma. La clairance de l'eau libre est calculée en soustrayant du débit urinaire (D exprimé en ml/min), la clairance osmolaire (N = 2 à 4 ml/min), soit :

- chez un sujet sain, la clairance de l'eau libre est de – 3 à – 1 ml/min (urines légèrement concentrées) ;
- au cours des déshydratations, la clairance de l'eau libre est fortement négative (urines très concentrées) ;
- au cours des hyperhydratations, du diabète insipide ou de diurèse aqueuse, la clairance de l'eau libre est positive (urines diluées).

## D. Épreuves dynamiques

*But* : il s'agit de rechercher une insuffisance de sécrétion d'AVP ou plus rarement une hypersécrétion (syndrome de Schwartz-Bartter). Le *tableau 5* résume les principales caractéristiques de ces épreuves.

## E. Syndrome de Schwartz-Bartter

Il s'agit d'une hypersécrétion d'arginine vasopressine posthypophysaire. Il peut également s'observer dans les cas de cancer bronchique, de porphyrie et d'intoxication à la colchicine. La cause peut être une libération par la tumeur de substances AVP-like. Le bilan biologique montre une hyperhydratation et une hyponatrémie.

**Tableau 5.** Explorations dynamiques des compartiments hydriques.

| Épreuve | Protocole | Sujet sain (et potomanie) | Diabète insipide |
|---|---|---|---|
| Restriction hydrique | | Hypertonie plasmatique<br>Hypovolémie<br>Réduction de la diurèse | Épreuve mal supportée<br>Diurèse normale<br>Clairance de l'eau libre normale |
| Charge saline | | | |
| Épreuve de Carter et Robbins (risque de collapsus) | 1 500 ml d'eau *per os* + 750 ml de NaCl hypertonique intraveineux | Augmentation de la diurèse<br>Diminution de l'osmolalité urinaire | Pas de modification |
| Épreuve de Decourt | 1er jour : 600 ml d'eau *per os*<br>2e jour : 600 ml d'eau *per os* + (600 ml d'eau et 5,40 g de NaCl). | Diminution de la diurèse de 50 % au 2e jour<br>Diminution de la clairance de l'eau libre au 2e jour | Diurèse normale ou augmentée<br>Clairance de l'eau libre normale |
| Test à l'AVP* | 5 unités sous-cutanées | Diminution de la diurèse de 80 %<br>*Idem* pour le diabète sucré | Diabète insipide central : osmolalité doublée<br>Diabète insipide d'origine néphrogénique** : pas de modification. |

* anciennement test à l'extrait posthypophysaire abandonné en raison de risques de contamination.
** pathologie héréditaire : manque de sensibilité du récepteur tubulaire à l'AVP.

# IV. Troubles de l'hydratation

Chaque compartiment extra- ou intracellulaire peut être hypo- ou hyperhydraté en fonction de son volume. Le contenu en eau totale de l'organisme n'est pas directement régulé. L'osmolalité extracellulaire efficace (N = 290 ± 5 mOsm/kg) est la variable principale régulée qui conditionne les mouvements d'eau entre les divers secteurs. Une hyperosmolalité extracellulaire entraîne un mouvement d'eau de la cellule vers le tissu interstitiel et cause une déshydratation intracellulaire. À l'inverse, une osmolalité abaissée entraînera des mouvements d'eau du secteur extracellulaire vers le secteur intracellulaire.
Compte tenu du rôle joué par la natrémie dans l'osmolalité extracellulaire, les perturbations du bilan hydrique seront associées à des perturbations de la balance sodique.
Théoriquement, on pourra classer les différents troubles en quatre catégories :
- hyperhydratation intracellulaire ;
- hyperhydratation extracellulaire ;
- déshydratation intracellulaire ;
- déshydratation extracellulaire.

En fait, il est fréquent d'observer en pathologie des syndromes associant l'un ou l'autre de ces troubles. C'est pourquoi, pour classer les déshydratations et les hyperhydratations, on tient compte des anomalies de l'osmolalité, en particulier celles de l'ion sodium. Ces anomalies sont explorées par la détermination de l'osmolalité plasmatique et urinaire et par le dosage de l'ion sodium dans les urines et le plasma, avec en complément la détermination des paramètres cités plus haut (paramètres hématologiques et dosage des protéines totales plasmatiques).

## A. Hyperhydratations

On entend par « hyperhydratation » un bilan positif de l'eau se traduisant par une augmentation du volume des secteurs extracellulaires ou intracellulaires ou les deux à la fois. Les hyperhydratations sont dues à une rétention d'eau avec augmentation du volume du secteur interstitiel ou des secteurs extra- ou intracellulaires.

### 1. Hyperhydratations isotoniques

L'accumulation de liquide isotonique dans le secteur extracellulaire ne modifie pas l'osmolalité. Le secteur intracellulaire reste inchangé.
Si la rétention hydrique est discrète (< 2 L), c'est-à-dire une augmentation du poids de 2 kg, le sujet est préœdémateux. Si la quantité est plus importante, on observera des modifications de la composition sanguine témoignant d'une hyperhydratation extracellulaire :
- baisse de la numération globulaire ;
- baisse de l'hémoglobine ;
- baisse de l'hématocrite ;
- baisse des protéines plasmatiques ;
- l'osmolalité et donc la concentration des électrolytes restent inchangés.

Lorsque l'œdème s'installe, on observera une augmentation des volumes des parties déclives, variables selon la position du corps. Un œdème plus important provoque une anasarque avec épanchements pleuraux et péricardiques et formation d'ascite.
L'insuffisance ventriculaire droite, le coma hépatique et le syndrome néphrotique peuvent avoir pour conséquences une hyperhydratation extracellulaire. L'œdème aigu du poumon et l'œdème cérébral sont des complications graves de ces hyperhydratations (*tab. 6*).
On pourra noter une légère augmentation de la tension artérielle.

**Tableau 6.** Classification des œdèmes cutanés.

| Maladies | Causes de l'œdème | Conséquences et complications |
|---|---|---|
| Insuffisance cardiaque globale<br>Insuffisance ventriculaire droite | Pression hydrostatique ↑ | Débit cardiaque ↓<br>Excrétion rénale ↓<br>Rétention sodée ↓ |
| Hypertension veineuse<br>Phlébites | Pression hydrostatique ↑ | Sécrétion d'aldostérone ↑↑ |
| Syndrome néphrotique | Albumine ↓<br>par perte urinaire | Volémie ↓<br>Aldostérone ↑ |
| Syndrome de carence<br>Kwashiorkor | Protéines ↓<br>par carence en acides aminés | Idem |
| Cirrhose ascitique<br>Hépatites subaiguës | Albumine ↓<br>par défaut de synthèse | Troubles hémodynamiques<br>Volume circulant ↓<br>Sécrétion d'aldostérone ↑ |
| Allergies, dermatoses<br>Œdème de Quincke | Trouble local ou généralisé de la perméabilité capillaire | Volume circulant ↓<br>Collapsus<br>Inflammation locale ou générale |

### a) Signes biologiques

En général, les signes biologiques sont peu importants :
- légère hémodilution ;
- concentration de sodium normale. Mais, à cause de l'hypervolémie, la quantité totale de sodium est importante ;
- le sodium urinaire est en baisse ;
- le potassium urinaire augmente.

### b) Traitements

- Diurétiques appropriés (élimination rénale du Na).
- Régime désodé.

## 2. Hyperhydratations hypotoniques

Lors d'un bilan hydrique positif, sans modification de l'ion sodium, seule de l'eau s'accumule.

#### a) Étiologies

- Apport excessif d'eau ou de liquide hypotonique (bière), la quantité globale de sodium reste inchangée, il s'agit d'une intoxication par l'eau.
- Apport excessif d'eau et transfert pathologique du sodium dans le liquide intracellulaire, on observe une élévation de la teneur globale en sodium.

#### b) Symptômes

- Œdèmes.
- Dégoût de l'eau, nausées, fatigue, asthénie.
- Vomissements, diarrhées.
- Crampes musculaires (altération du flux de $Ca^{++}$ et $K^{+}$).
- Convulsions et troubles psychiques.
- Coma.

Ces deux derniers symptômes évoquent une hyperhydratation des cellules cérébrales.

#### c) Signes biologiques

- Débit urinaire faible.
- Osmolalité plasmatique faible.
- Osmolalité urinaire élevée.
- Numération globulaire, hémoglobine, protéines, hématocrite en baisse.
- Sodium normal ou inférieur à 135 mmol/L.

#### d) Traitements

Les traitements sont difficiles. Ils consistent :
- en une diminution des apports hydriques et sodés ;
- une utilisation des diurétiques ;
- et, si nécessaire, dialyse en cas d'insuffisance rénale.

Il est important de savoir si la teneur globale en sodium est inchangée ou augmentée :
- si inchangée, l'anomalie peut être d'origine exogène. Il peut s'agir d'une augmentation de la concentration en glucose (diabète) ou de perfusion de glucosé excessive (augmentation de la pression osmotique) ;
- si augmentée, l'hyponatrémie est de règle. L'osmolalité est abaissée. On pourra observer des anomalies de l'équilibre acide-base et des anomalies du métabolisme du potassium. Les conséquences sont des perturbations du métabolisme énergétique et des échanges membranaires.

### 3. Hyperhydratations hypertoniques

La cause principale des hyperhydratations hypertoniques est l'apport ou la rétention de sodium plus important que les apports ou la rétention d'eau.
De telles modifications sont rarement observées et, en tout cas, rapidement corrigées.

## B. Déshydratations

*Définitions* : on entend par « déshydratation » un bilan négatif de l'eau se traduisant par une diminution du volume des secteurs extracellulaire ou intracellulaire

ou les deux à la fois. En pathologie, les déshydratations pourront être étudiées sous l'angle de l'osmolalité, de la natrémie et de l'hypovolémie.

## 1. Déshydratations isotoniques

Il s'agit d'une perte d'eau accompagnée d'une perte d'électrolytes en quantité équivalente. L'osmolalité et le volume du secteur intracellulaire restent inchangés. On les classe en fonction de leur origine : intravasculaire, intracellulaire, globale.

### a) Signes cliniques

En général, ils sont tardifs :
- sécheresse de la peau ;
- persistance du pli cutané ;
- yeux cernés ;
- hypotonies des globes oculaires.

L'aggravation se traduit par une insuffisance circulatoire, une hypotension, tachycardie et un collapsus, avec un état de choc.

### b) Signes biologiques

Les signes biologiques sont souvent peu marqués :
- dans les urines :
  - débit urinaire faible < 0,5 ml/min,
  - le sodium et les chlorures sont faibles, sauf si la fuite hydrique est d'origine rénale ;
- dans le sang :
  - augmentation de l'hématocrite,
  - augmentation de l'hémoglobine,
  - augmentation des protéines,
  - le sodium est dans les limites de la normale,
  - le potassium est normal,
  - l'osmolalité est normale,
  - légères anomalies de l'équilibre acide-base qui sont compensées,
  - l'urée plasmatique est élevée par exagération du catabolisme azoté.

### c) Complications

Ces déshydratations peuvent devenir hypo- ou hypertoniques.

### d) Traitements

Administration orale ou en intraveineuse (IV) d'eau et de sodium sous forme de chlorure ou de bicarbonate. Si un collapsus est observé, on rétablira la volémie avec du plasma.

### e) Surveillance

La surveillance se fait par la reprise de la diurèse et de l'élimination du sodium. On déterminera l'hématocrite, les protéines, l'hémoglobine et l'urée.

## 2. Déshydratations hypotoniques

Il s'agit d'une perte de sodium plus importante que la perte d'eau. La déshydratation est d'abord extracellulaire et devient rapidement globale.

### a) Signes cliniques

- Pas de soif (hypotonicité).
- Fatigue, asthénie.
- Vertiges, nausée, vomissements.
- Hypotension, fréquence cardiaque augmentée.

### b) Signes biologiques

- Augmentation de l'hématocrite, de l'hémoglobine, de protéines, de la numération globulaire.
- Augmentation de l'urée et de la créatinine plasmatique (flux rénal diminué).
- Baisse du sodium et de l'osmolalité.
- Urines : volume normal ou diminué, sodium et chlorure faible.

### c) Étiologies

- Insuffisance rénale chronique avec abus de régime désodé, diurèse osmotique ou perfusion importante de glucosé.
- Nécrose tubulaire aiguë entraînant des pertes considérables de sodium et de chlorures.
- Acidose tubulaire rénale pouvant aboutir à un déficit hydrique et sodé.
- Abus de diurétiques.
- Crise aiguë d'insuffisance surrénalienne.
- Acidose métabolique (excrétion exagérée de sodium et de chlorure).

**Tableau 7.** Origine des déshydratations globales.

| Maladies | Causes |
|---|---|
| 1. Pertes d'eau<br>Origine posthypophysaire<br>Diabète insipide | Lésion hypothalamique<br>Sensible à l'administration d'arginine vasopressine |
| 2. Pertes d'eau par voie rénale<br>Diurèse osmotique<br>Reins sains<br>Insuffisance rénale<br>Néphropathie avec polyurie | <br>Diabète sucré<br>Hypercatabolisme protéique, débâcle uréique<br>Réductions du nombre de néphrons actifs<br>Tubulopathie au cours du syndrome de Toni-Debré-Fanconi<br>Hypokaliémie, hypercalcémie acquises |
| 3. Pertes par voies digestives<br>Diarrhées, vomissements | Pertes de liquides hypotoniques avec fièvre<br>Incapacité de concentrer les urines chez l'enfant |
| 4. Pertes d'eau par voie cutanée<br>Travail musculaire intense<br>En atmosphère chaude et sèche<br>Vie en zone désertique, naufragé | Sueurs abondantes<br>Apports hydriques insuffisants |
| 5. Pertes d'eau par voie respiratoire<br>Polypnées fébriles<br>Comateux trachéotomisés | Les pertes d'eau sont en rapport avec la température ou la ventilation |
| 6. Pertes d'eau iatrogènes | Perfusions excessives de solutés hypertoniques<br>Hémodialyse ou dialyse péritonéale prolongées |
| 7. Hypernatrémie essentielle | Dérèglement des osmorécepteurs |

### 3. Déshydratations hypertoniques

La perte d'eau est prépondérante : on observera une diminution du volume des compartiments intra- et extracellulaire.
Compte tenu que l'espace intracellulaire représente près des deux tiers de l'eau totale, on peut observer les symptômes d'une déshydratation globale lors d'une déshydratation importante.

#### a) Signes cliniques

- Soif intense.
- Sécheresse de la peau et des muqueuses.
- Oligurie.

#### b) Origine

- Pertes digestives, cutanées, rénales, respiratoires.
- Diabète insipide.

#### c) Signes biologiques

- Augmentation de la numération globulaire.
- Augmentation de l'hémoglobine.
- Le volume globulaire moyen (VGM) est diminué.
- L'hématocrite est peu modifié.
- Augmentation des protéines.
- L'osmolalité plasmatique est augmentée.

#### d) Traitements

- Eau pure *per os*.
- Solutés hypotoniques IV ou en perfusion, puis salés pour rétablir le capital hydroélectrolytique.

## V. Volémie, déshydratation et hyperhydratation

Dans beaucoup de désordres hydroélectrolytiques, les pertes liquidiennes entraînent une déplétion du volume extracellulaire. Ce type de déplétion, si elle a un caractère sévère, peut évoluer vers un choc fatal. Une hypovolémie résulte d'abord d'une perte d'eau et/ou de sodium à partir de différents sites :
- fuites digestives : vomissements, diarrhées, saignements ou aspiration digestive ;
- pertes rénales : diurétiques, diurèse osmotique, néphropathies, hyperaldostéronisme ;
- pertes cutanées, respiratoires, sudorales, brûlures ;
- séquestration dans un troisième secteur : obstruction intestinale, lésions d'attrition, fracture, pancréatite aiguë.

D'un point de vue biologique, il suffit de se souvenir que le rôle du rein est de conserver l'eau et le sel pour maintenir le volume extracellulaire. À l'exception des

états au cours desquels le rein est responsable de la pathologie, la concentration du sodium urinaire est très faible dans les hypovolémies et peut s'abaisser jusqu'à 1 mmol/L. La concentration des chlorures urinaires est parallèle à celle du sodium, à l'exception des situations au cours desquelles le sodium est obligatoirement excrété avec un autre anion (bicarbonate, corps cétoniques). Au cours des hypovolémies, l'urine sera relativement concentrée (rétention d'eau) et l'osmolalité sera élevée.

La concentration plasmatique du sodium peut être affectée de diverses manières. Si les pertes sont des pertes d'eau pure (diabète insipide), cela conduit à une hypernatrémie. Inversement, une perte de sel et d'eau, avec hypovolémie, peut être associée à une hyponatrémie.

La concentration plasmatique du potassium est variable au cours des hypovolémies. Une hyperkaliémie ou une hypokaliémie peuvent être observées.

L'équilibre acide-base peut être affecté. Les patients avec vomissements, aspiration gastrique ou diurétique (facteurs d'hypovolémie) ont tendance à l'alcalose métabolique, par perte de protons, de sodium et de chlorures.

On ne doit pas confondre déshydratation et hypovolémie. On doit reprendre certaines définitions pour éviter les erreurs :

- l'osmolalité se définit comme étant le rapport des solutés plasmatiques (essentiellement sodium) à l'eau plasmatique. Cette osmolalité est régulée de façon très fine (1 % ou 2 %) par l'arginine vasopressine et par la sensation de soif. L'osmolalité plasmatique mesurée par cryoscopie est normalement de 290 ± 5 mOsm/kg. En fait, le véritable reflet de la pression osmotique est l'osmolalité efficace, c'est-à-dire l'osmolalité totale diminuée de l'urée et du glucose, ces molécules diffusant librement en temps normal. L'osmolalité efficace ainsi obtenue est de 280 ± 5 mOsm/L. Les sels de sodium représentent à eux seuls près de 95 % de cette valeur. La valeur du sodium plasmatique reflète donc l'osmolalité efficace extracellulaire ;
- le volume extracellulaire liquidien est déterminé par la quantité absolue de sodium et d'eau présente dans l'organisme. Chez le sujet sain, le volume extracellulaire représente à peu près 40 % de l'eau totale, le reste étant pratiquement intracellulaire. Le volume extracellulaire est régulé par l'excrétion du sodium sous la dépendance du système rénine-angiotensine-aldostérone, le système sympathique et la sécrétion du peptide atrial natriurétique (ANP).

Parmi les désordres de la balance hydrique et sodée, on peut en retenir quatre :

- l'hyponatrémie : reflet d'un excès relatif d'eau par rapport au sodium. Elle est toujours en relation avec une incapacité d'excrétion de l'eau ingérée ou perfusée ;
- l'hypernatrémie : reflet d'un déficit relatif d'eau par rapport au sodium. Exceptionnelle par l'administration de solutés, elle est plus fréquente par l'absence de remplacement des pertes hydriques. La perte d'eau isolée est nommée déshydratation ;
- l'hypovolémie peut découler de la combinaison de plusieurs facteurs isolés ou associés. Il s'agit d'une situation au cours de laquelle le volume extracellulaire est réduit. Cette hypovolémie provient de plusieurs situations avec perte d'eau et de sels : pertes digestives, saignements, séquestration vers un troisième secteur, pertes d'eau pure (déshydratations). L'hypovolémie est le résultat de la

perte d'eau du secteur extracellulaire, alors que la déshydratation résulte de la perte d'eau et de sels provenant de l'eau totale de l'organisme. Ainsi, les patients déshydratés présenteront une hypernatrémie, alors que les patients ayant perdu de l'eau et du sodium auront une natrémie normale, peut-être légèrement augmentée ;
- l'œdème est le reflet d'un excès de sodium et d'hypervolémie. Chez ces patients, on n'observe pas d'hypernatrémie en raison de la stimulation de l'AVP et de la soif, ce qui aboutit à une rétention d'eau proportionnelle à la quantité de sels retenus. Lorsque l'excès de sels est la conséquence d'une insuffisance cardiaque, d'une cirrhose ou d'un syndrome néphrotique, l'accumulation d'eau et de sels est prédominante dans le secteur interstitiel (ou extravasculaire), si bien que les patients peuvent également présenter une déplétion de la volémie efficace. La tonicité plasmatique est le paramètre directement perçu par les osmorécepteurs. Elle est déterminée essentiellement par la concentration des sels de sodium et affecte directement la distribution transcellulaire de l'eau. L'urée, très diffusible dans tous les secteurs, ne contribue pas à la tonicité. En revanche, elle contribue à l'osmolalité plasmatique. L'osmolalité plasmatique peut être calculée approximativement par la formule suivante :

$$\text{Osmolalité efficace} = 2(\text{natrémie} + \text{kaliémie}) + \text{glycémie}.$$

## VI. Ion sodium

L'ion sodium est l'électrolyte majeur du liquide extracellulaire (plasma et liquide interstitiel), alors que les ions potassium et magnésium sont prépondérants dans le liquide intracellulaire. L'ion sodium est irremplaçable, toute variation de la natrémie entraîne des mouvements hydriques.

### A. Entrées

Elles sont d'origine alimentaire. Elles varient considérablement entre 3 et 12 g de sel par jour.

### B. Sorties

- Digestives : essentiellement fécales, 10 mmol/jour.
- Sueur : de 20 à 35 mmol/jour.
- Urine : 80 à 90 % du sodium sont excrétés par les urines, 22 000 mmol/jour de sodium passent par les tubes rénaux.

### C. Régulation

La régulation de l'osmolalité plasmatique et donc de son principal constituant, l'ion sodium, est obtenue par des variations des apports en eau ou de l'excrétion de cette eau. Par conséquent, les altérations de la natrémie (hyponatrémie ou

hypernatrémie) impliquent les facteurs affectant la balance hydrique, c'est-à-dire la sécrétion d'AVP et la soif.

## D. Hyponatrémie

L'hyponatrémie se définit à partir d'une concentration du sodium plasmatique inférieure à 134 mmol/L (N = 134 à 142 mmol/L). Cette hyponatrémie est liée à une diminution de l'osmolalité plasmatique (hypotonicité extracellulaire). L'hyponatrémie, chez presque tous les patients, reflète une rétention d'eau par le rein due à son incapacité d'excréter cette eau. Il s'agit le plus souvent d'une sécrétion persistante d'AVP.
On écartera de cette définition les fausses hyponatrémies, dues à une augmentation de la phase non aqueuse du plasma telles que l'on peut les observer dans les hyperlipémies ou les hyperprotidémies. C'était fréquent autrefois, lorsque la détermination du sodium plasmatique était réalisée par photométrie de flamme. Actuellement, l'utilisation de la potentiométrie (électrodes spécifiques) donne la valeur du sodium dans la phase aqueuse. Des corrections ont été mises en place pour adapter les valeurs usuelles.
En pratique, on distingue deux cas d'hyponatrémie : l'hyponatrémie hyperosmolaire et l'hyponatrémie hypo-osmolaire.
Dans le premier cas, il s'agit d'hyponatrémie de dilution (hypervolémie) due à une hyperglycémie ou à une perfusion de mannitol. Dans le second, il s'agit d'une perte globale de sodium, d'une augmentation des apports ou de la rétention d'eau.

## E. Causes des hyponatrémies hypo-osmolaires

Dans pratiquement tous les cas, l'hyponatrémie résulte d'un apport excessif d'eau, dépassant les capacités d'élimination rénale. La réponse normale à une charge hydrique est une suppression de la sécrétion d'AVP permettant l'excrétion rapide d'une urine diluée. L'hyponatrémie hypo-osmolaire est une affection relativement fréquente, dont le principal risque est le développement d'un œdème cérébral lié à l'hyperhydratation intracellulaire.

### 1. Hyponatrémie avec sécrétion d'arginine vasopressine élevée

Les deux principales causes d'hyponatrémies hypo-osmolaires sont l'hypovolémie et le syndrome de sécrétion inappropriée d'AVP. Par l'intermédiaire des barorécepteurs carotidiens, l'hypovolémie (diminution de la perfusion tissulaire) est un stimulus très puissant de la sécrétion d'AVP.
*Vomissements, diarrhées, saignements ou pertes urinaires* sont responsables d'hyponatrémie par hypovolémie. Chez ces patients, le déficit en sodium est supérieur au déficit en eau.
*Pertes gastro-intestinales liées à un troisième secteur* : elles sont liées à une rétention très forte de sodium par le rein qui répond à la contraction volémique en conservant le chlorure de sodium. La diurèse est faible (rétention d'eau) mais la concentration en sodium est habituellement inférieure à 20 mmol/L (rétention sodée). En cas d'alcalose métabolique, l'excrétion des bicarbonates oblige l'excrétion du

sodium. La natriurie peut être supérieure à 20 mmol/L, mais les chlorures urinaires restent inférieurs à 10 mmol/L.

*Diurétiques thiazidiques* : ces diurétiques, à action tubulaire distale, provoquent occasionnellement des hyponatrémies aiguës et sévères. Un traitement mal adapté, où l'automédication (cures d'amaigrissement) est l'une des causes les plus fréquentes d'hyponatrémie hypovolémique, associée à une concentration élevée du sodium urinaire (rétention d'eau)

*Néphropathies avec perte de sels* : on observe cela chez des patients souffrant d'insuffisance rénale chronique. Ces derniers peuvent développer une fuite des bicarbonates avec fuite obligatoire du sodium. La natriurie sera élevée, associée à une hyperkaliémie et à une augmentation de degré variable de la créatinine. Cela suggère un déficit en minéralocorticoïdes.

*Diurèse osmotique* (fuite obligatoire de sodium créant une déplétion volémique) : au cours du diabète, la fuite du sodium est aggravée par l'acétonurie. La présence de corps cétoniques dans les urines s'accompagne d'une fuite obligatoire de sodium dans les urines, aggravant les pertes rénales observées dans l'acidocétose diabétique.

*Syndromes œdémateux, baisse de la filtration glomérulaire* (hypovolémie efficace ou relative) : l'hyponatrémie est observée dans l'insuffisance cardiaque congestive (diminution de la pression artérielle et du débit cardiaque), dans le syndrome néphrotique (contraction du volume intravasculaire avec une concentration d'albumine plasmatique inférieure à 20 g/L), dans l'insuffisance hépatique (hypovolémie par vasodilatation périphérique et séquestration splanchnique) aboutissant à une rétention rénale de sodium. Lorsque la cirrhose s'aggrave, on observe une augmentation progressive de la concentration plasmatique de la rénine et de l'activité de l'AVP.

## 2. Hyponatrémie avec sécrétion inadéquate d'arginine vasopressine

La sécrétion inappropriée d'AVP conduit à une libération permanente d'AVP. Ces maladies ne sont pas associées à une hypovolémie. Il s'agit d'une cause fréquente chez les patients hospitalisés et le diagnostic est un diagnostic d'exclusion.

### a) Infections, cancers, maladies du système nerveux central

Les causes les plus fréquentes sont les cancers, les pneumopathies et les maladies du système nerveux central. Trente-cinq pour cent des patients atteints par le VIH et hospitalisés présentent une hyponatrémie par libération permanente d'AVP. Dans ces conditions précises, le traitement de l'hyponatrémie est d'une part inutile parce que les patients sont asymptomatiques et d'autre part inefficace parce que la natrémie basse est reconnue comme normale par l'organisme. Par ailleurs, chez ces patients, une augmentation de la natrémie stimulera la soif.

### b) Médicaments, causes iatrogènes

Certaines formes de libération permanente d'AVP sont liées à des causes médicamenteuses ou iatrogènes. C'est le cas de patients présentant une psychose aiguë en relation avec une schizophrénie (augmentation de la perception de la soif, polydipsie). Les médicaments antipsychotiques pourraient jouer un rôle à ce niveau.

L'hyponatrémie est également fréquente après une intervention chirurgicale en raison d'une concentration d'AVP circulante très élevée (stress, douleurs, anesthésiques, perfusion de solutés sans électrolytes).

Les médicaments analogues de l'AVP (desmopressine) ou agonistes de sa libération peuvent être responsables d'hyponatrémie. D'autres médicaments sont connus pour entraîner une hyponatrémie : psychoactifs (fluoxétine, sertaline, halopéridol, amitryptiline, ecstasy), anticancéreux (vincristine, vinblastine, cyclophosphamide) et d'autres (carbamazépine, bromocriptine, chlorpropamide, vasopressine).

#### c) Causes endocrines

Les causes endocrines d'hyponatrémie sont essentiellement l'insuffisance surrénalienne (déficit en cortisol ou d'aldostérone) et l'hypothyroïdie avec myxœdème (diminution du débit cardiaque et de la filtration glomérulaire).

### 3. Hyponatrémie hypo-osmolaire avec suppression de la sécrétion d'arginine vasopressine

Trois causes sont responsables d'hyponatrémie hypo-osmolaire avec arrêt de la sécrétion d'AVP.

#### a) Insuffisance rénale

Dans le stade avancé de l'insuffisance rénale, l'osmolalité urinaire minimale augmente jusqu'à 200 ou 250 mOsm/kg. Les néphrons fonctionnels sont incapables d'effectuer une dilution maximale des urines. Si les apports en eau dépassent le seuil, une balance hydrique positive s'installe avec hyponatrémie.

#### b) Polydipsie primitive

Il s'agit le plus souvent d'une lésion de l'hypothalamus (centre régulateur de la soif), de troubles psychiatriques ou bien de malades traités par des médicaments antipsychotiques (effets secondaires de sécheresse de la bouche, stimulant la sensation de soif).

#### c) Malnutrition

Les buveurs de bière et les patients malnutris peuvent développer une diminution très importante des capacités d'excrétion d'eau, directement liée à la diminution des apports alimentaires. La bière contient relativement peu d'électrolytes et de protéines. En revanche, la charge glucidique supprime le catabolisme protéique endogène, et l'excrétion de l'urée devient donc négligeable. Cela aboutit à la réduction de la capacité maximale d'élimination des urines. Les apports hydriques étant supérieurs à la capacité d'excrétion, l'hyponatrémie s'installe.

## F. Hypernatrémie

Il s'agit de l'augmentation de la concentration plasmatique du sodium. Elle se définit pour une concentration du sodium plasmatique supérieure à 146 mmol/L. L'augmentation de la natrémie et de l'osmolalité induit un mouvement d'eau depuis les cellules (y compris cérébrales) vers le secteur extracellulaire. L'hypernatrémie est la conséquence d'un déficit relatif en eau par rapport aux solutés. Le plus souvent, l'hypernatrémie reflète la perte d'eau libre. Plus rarement, elle est obtenue par l'administration de perfusion sodée hypertonique. Une hypernatrémie prolongée ne peut persister chez les sujets normaux, parce que l'augmentation de la tonicité plasmati-

que (entre 1 et 2 %) induit à la fois la sécrétion d'AVP et la sensation de soif. L'hypernatrémie survient en conséquence essentiellement chez des patients incapables d'exprimer leurs besoins en eau, les enfants et les personnes avec une fonction neurologique altérée. L'hypernatrémie liée à une perte d'eau est une déshydratation.

## G. Causes des hypernatrémies

### 1. Pertes d'eau non compensées

Les pertes d'eau sans pertes d'électrolytes aboutissent à l'hypernatrémie si elles ne sont pas compensées. Parmi les pertes d'eau, c'est surtout la composition en électrolytes (sodium, potassium) qui détermine l'effet sur la natrémie. Ainsi, une perte de liquide isotonique au plasma (diarrhées) entraîne une déplétion isotonique (hypovolémie), mais elle n'a pas d'effet direct sur la natrémie. En revanche, les diarrhées d'origine virale (gastro-entérite) ou médicamenteuse (lactulose, charbon-sorbitol) induisent une hypernatrémie, parce que les pertes en eau sont supérieures aux pertes en sodium et en potassium. Les mêmes observations peuvent être pratiquées en ce qui concerne les diurèses osmotiques induites par le mannitol, le glucose ou l'urée. Des pertes incontrôlées, d'origine cutanée (sueur) ou pulmonaire (liquides hypotoniques), peuvent conduire à l'hypernatrémie, surtout en cas de fièvre (hyperventilation), d'exercice physique intense et de séjour en climat chaud.

### 2. Diabète insipide d'origine centrale, diabète néphrogénique

La diminution des effets de l'AVP sur le rein (ou la diminution de sa libération) mène à une urine relativement diluée. Chez ces patients, les mécanismes régulateurs de la soif sont normaux. Il en résulte un syndrome polyuropolydipsique. La natrémie est au moins dans les valeurs hautes des valeurs usuelles.

### 3. Lésions affectant les centres régulateurs de la soif et de l'osmorégulation

Lorsqu'il existe une lésion hypothalamique primitive altérant la soif (hypodipsie), une hypernatrémie peut survenir en l'absence d'augmentation des apports en eau. Plusieurs pathologies peuvent conduire à ce type d'hypernatrémie par ce mécanisme (maladies vasculaires, cancers).

### 4. Transfert intracellulaire et perte d'eau

L'exercice intense, les crises convulsives (associées à une acidose lactique) peuvent entraîner une hypernatrémie transitoire de quelque 10 à 15 mmol/L. Dans ce cas, il s'agit de la dégradation massive du glycogène qui conduit à augmenter la concentration intracellulaire des lactates, osmotiquement actifs. Il s'ensuit une augmentation de l'osmolalité intracellulaire et transfert d'eau dans la cellule. La natrémie retrouve des valeurs pratiquement normales en un quart d'heure, dès que l'exercice (ou les crises) cesse.

### 5. Surcharge en sodium

L'administration de solutés salés hypertoniques peut induire une hypernatrémie aiguë, dont la concentration plasmatique peut atteindre, voire dépasser, les 170 mmol/L. Cela peut être observé chez l'enfant, au cours d'intoxication, au cours de perfusion de bicarbonates de sodium en vue de la correction d'une acidose métabolique. On peut éventuellement observer une hypernatrémie chez des sujets ingérant des solutions émétiques, richement chargées en sels. Si la fonction rénale est normale, l'hypernatrémie par surcharge en sel se corrige spontanément.

### 6. Traitements

Le traitement d'une hypernatrémie doit répondre à deux questions essentielles : quelles sont les pertes en eau (quel est le déficit en eau) ? À quelle vitesse faut-il faire les corrections de la natrémie ?
Le déficit en eau peut se calculer de façon relativement simple : le contenu en eau représente habituellement 60 % de la masse corporelle chez l'homme et 50 % de la masse corporelle chez la femme. On a l'habitude, chez des patients hypernatrémiques de diminuer ces pourcentages de 10 %. Par exemple, soit une patiente de 65 kg, avec une natrémie de 170 mmol/L. Sa masse en eau totale est de 65 × 0,4 soit 26 litres. Le déficit sera donc de 5,5 litres.
À quelle vitesse ? Une correction trop rapide est dangereuse et expose à un œdème cérébral avec séquelles neurologiques. Habituellement, la correction doit se faire sur 48 à 72 heures, c'est-à-dire assez lentement (0,5 mmol/L par heure). De préférence, l'eau doit être administrée *per os* ou en intragastrique.
Évidemment, le traitement étiologique est essentiel.

## VII. Ion chlorure

Il s'agit du principal anion des liquides extracellulaires.

### A. Répartition

2 000 mmol chez l'adulte, réparties de la façon suivante :

- 1 700 mmol dans les liquides extracellulaires ;
- 52 mmol/L dans les érythrocytes (80-85 mmol/L d'eau érythrocytaire) ;
- 200 mmol dans les cellules gastriques dont 180 échangeables ;
- concentration plasmatique : 95 à 105 mmol/L.

### B. Entrées

Les entrées sont liées à celles du sodium et du potassium, soit de 140 à 350 mmol/jour. Les deux tiers proviennent du sel de cuisine.

## C. Sorties

Les sorties sont presque exclusivement urinaires et les pertes sudorales comptent pour environ 32 mmol/L de sueur. Les pertes digestives sont négligeables car totalement réabsorbées :
- salive : 15 mmol/L ;
- suc gastrique : 140 mmol/L ;
- bile : 100 mmol/L ;
- suc pancréatique : 50 mmol/L ;
- suc intestinal : 100 mmol/L.

Ces pertes digestives peuvent devenir importantes en cas de vomissements, diarrhées ou lavages gastriques.

## D. Hyperchlorémies

Les hyperchlorémies se définissent par des taux plasmatiques de chlorures supérieurs à 110 mmol/L. Elles sont causées par :
- hypernatrémie due à des déshydratations cellulaires ou globales ;
- désordre de l'équilibre acide-base :
  - acidose métabolique, réduction de bicarbonates due à un apport de chlorure ou à une rétention de chlorure,
  - alcalose gazeuse, quelquefois réabsorption rénale de chlorures,
  - intoxication par le chlorure d'ammonium,
  - pertes digestives de bicarbonates par diarrhées,
  - tubulopathie congénitale de l'enfant,
  - intoxication par l'acétazolamide.

## E. Hypochlorémies

Les hypochlorémies se définissent par un taux de chlorures inférieurs à 95 mmol/L. Elles sont causées par :
- déficit en sel, dilution ou les deux. Le plus souvent, ces troubles sont conjugués à une élévation des bicarbonates (alcalose métabolique, acidose respiratoire) ;
- acidose métabolique, dans ce cas, l'ion chlorure est remplacé par :
  - des ions sulfates ou phosphates (insuffisance rénale),
  - des acides organiques : lactate (anoxie),
  - du β-hydroxybutyrate et l'acétoacétate (coma diabétique),
  - de l'oxalate (intoxication par l'éthylène glycol),
  - des ions bromures ou nitrates (intoxications).

# VIII. Ion potassium

L'ion potassium est le principal cation intracellulaire et le plus abondant de l'organisme. Quatre-vingt-dix-huit pour cent des 3 500 à 4 000 mmol de l'organisme se

situent dans le liquide intracellulaire et seulement 60 mmol dans le secteur extracellulaire. Il joue un rôle fondamental dans le métabolisme hydrique de la cellule.

## A. Répartition

- Liquides extracellulaires : 2 % du capital potassique (60-75 mmol).
- Plasma et liquide interstitiel : 4,2 ± 0,4 mmol/L.
- Secteur cellulaire : 98 % du capital.
- 80 % dans le cytoplasme.
- 3 % dans le tissu conjonctif dense.
- 15 % dans l'os.
- Muscles squelettiques : 150 mmol/L d'eau intracellulaire.
- Érythrocytes : 120 mmol/L.

## B. Entrées

Réalisées par l'alimentation, soit 75 à 150 mmol/jour, soit environ 1 mmol/kg/jour, c'est-à-dire l'équivalent du contenu total du potassium extracellulaire. Les deux principales hormones favorisant l'entrée du potassium dans la cellule sont l'insuline et les catécholamines.

## C. Sorties

- Surtout urinaires : 45 à 90 mmol/jour.
- Fèces : 5 à 10 mmol/jour.
- Sueur : 2 à 5 mmol/jour.

## D. Pathologies

Deux pathologies sont envisagées :
- rétention potassique et hyperkaliémie ;
- déficit en potassium et hypokaliémie.

### 1. Rétention potassique et hyperkaliémie

Les rétentions sont toujours d'origine rénale. Cependant, beaucoup d'hyperkaliémies (qui ne s'accompagnent pas de rétention) peuvent avoir d'autres sources. Une rétention avec hyperkaliémie provoque toujours de graves troubles dès que la concentration plasmatique dépasse 5 mmol/L. Le pronostic vital est compromis au-dessus de 6 mmol/L.

#### a) Signes cliniques

- Manifestations neuromusculaires (fourmillements, piqûres d'épingle, atteinte motrice, paralysie flasque exceptionnelle).
- Troubles de la conduction cardiaque.
- L'acidose métabolique aggrave l'hyperkaliémie.

### b) Origines

- Insuffisances rénales sévères : au bout d'une semaine d'anurie, la rétention est augmentée par les apports exogènes et par les processus qui favorisent la sortie cellulaire du potassium (acidose, cytolyse, hyperhydratation).
- Insuffisances rénales chroniques : il s'agit plutôt d'un problème de régime. Certains diurétiques sont à éviter (rétention potassique).
- Poussées aiguës de la maladie d'Addison (rare).
- Surcharges en potassium d'origine alimentaire ou médicamenteuse.
- Attritions musculaires et écrasements des membres (accidents, destruction de cellules, hémolyse).
- Hémoglobinurie paroxystique.
- Septicémie hémolytique.
- Hémolyse par erreur transfusionnelle.
- Traitement radiothérapeutique ou antimitotique des leucémies.
- Grands brûlés : anomalies majorées par la déshydratation, l'insuffisance rénale et le choc.
- Diabète décompensé et acidocétose (carence en insuline). Les troubles de la kaliémie sont dus à plusieurs mécanismes : déshydratation, acidose, atteinte rénale, état de choc, absence de synthèse de glycogène, importance du catabolisme protéique. Dans ce cas, l'hyperkaliémie existe, malgré un déficit potassique considérable (pertes digestives et rénales).
- Exercice musculaire : une augmentation du potassium plasmatique peut être observée après un exercice. Pour une marche lente (0,3 à 0,4 mmol/L), pour un exercice modéré (0,7 à 1,2 mmol/L) et pour un exercice maximal (2 mmol/L).
- Hypoaldostéronisme : toute cause de diminution de la libération ou de l'effet tubulaire de l'aldostérone diminue l'excrétion rénale de potassium et aboutit à une hyperkaliémie.

### c) Surveillance et traitement de l'hyperkaliémie

- Surveillance préventive des apports alimentaires.
- Favoriser la diurèse.
- Prévenir et corriger l'acidose.
- Activer la synthèse de glycogène par l'insuline dans le coma diabétique.
- Activer la synthèse des protéines.

Soit :

- par l'utilisation de tampons alcalinisants ;
- calcium (gluconate de calcium antagoniste direct des effets membranaires de l'hyperkaliémie) ;
- par l'association glucose-insuline ;
- par les agonistes β2-adrénergiques (activation du transfert du potassium dans la cellule). Mais l'utilisation reste controversée en raison des risques de tachycardie et d'insuffisance coronaire chez les sujets prédisposés ;
- par l'utilisation de diurétiques ou de résines échangeuses d'ions ;
- par l'épuration extrarénale.

## 2. Déficit en potassium, hypokaliémie

Les hypokaliémies sont plus fréquentes que les hyponatrémies. Les hypokaliémies, avec déplétion potassique, trouvent leur origine dans des pertes urinaires dues à des anomalies rénales ou endocriniennes. Les hypokaliémies de transfert s'accompagnent d'une entrée exogène de potassium dans les cellules. En général, les hypokaliémies sont accompagnées d'alcaloses qui accentuent la fuite urinaire et l'entrée du potassium dans les cellules.
On peut définir une hypokaliémie à partir d'un seuil inférieur à 3,5 mmol/L. Elle est franche pour une kaliémie inférieure à 3 mmol/L.

### a) Signes cliniques

- Signes électrocardiographiques.
- Anomalies des muscles lisses et striés :
  – ralentissement du transit digestif ;
  – asthénie, hypotonie musculaire ;
  – paralysie flasque avec baisse des réflexes.

### b) Étiologie

- Les carences alimentaires sont rares.
- Déficits par pertes digestives : vomissements, aspiration gastrique diarrhée aiguë, abus de laxatif.
- Origine rénale (il s'agit d'une fuite potassique, en général le potassium urinaire est supérieur à 20 mmol/jour).
- Sécrétion corticosurrénalienne exagérée : augmentation du cortisol, hyperaldostéronisme primaire ou secondaire.
- Abus de diurétiques (étacrynique, chlorothiazide, furosémide).
- Abus de cortisone.
- Abus de réglisse.
- Alcalose thérapeutique (hyperventilation, intoxication par les barbituriques).
- Coma diabétique : hyperkaliémie puis, après traitement insulinique, hypokaliémie.
- Hyperactivité β2-adrénergique : les catécholamines font rentrer le potassium dans les cellules.
- Anabolisme cellulaire activé : traitement par la vitamine $B_{12}$ et par les folates pour traiter une anémie mégaloblastique. Certaines cellules peuvent capter le potassium après le prélèvement (leucémie myéloïde aiguë, avec hyperleucocytose).
- Intoxication au baryum et par la chloroquine.
- Pertes sudorales au cours d'exercice en climat chaud.

### c) Traitements

Les traitements dépendent de la sévérité du déficit potassique, mais aussi du mécanisme en cause. On estime qu'une baisse de la concentration potassique de 1 mmol/L correspond à la perte de 200 à 400 mmol de potassium. L'existence d'une acidose métabolique masque souvent le degré de la déplétion potassique. En règle générale, on préfère l'administration de chlorure de potassium *per os*, la voie intraveineuse étant réservée aux patients incapables d'avaler ou avec une hypokaliémie sévère. L'administration intraveineuse trop rapide est potentiellement dangereuse. L'administration de 20 mmol par heure permet d'augmenter la kaliémie de 0,25 mmol/L.

## L'essentiel de la question

En ce qui concerne l'hydratation, l'organisme humain peut schématiquement se diviser en deux secteurs : l'extracellulaire et l'intracellulaire. Ces deux secteurs sont en équilibre osmotique par le maintien d'une pression osmotique égale de part et d'autre de la membrane cellulaire. En clinique, l'état d'hydratation d'un sujet peut s'évaluer par la surveillance de son poids et par l'aspect de la peau et des muqueuses. En biologie courante, le volume du secteur extracellulaire est étudié par la mesure de paramètres hématologiques (hématocrite, hémoglobine, numération globulaire) et biochimiques (protéines totales plasmatiques). La pression osmotique évalue l'osmolalité plasmatique. Elle est étudiée en routine par la mesure de la natrémie. L'eau extracellulaire compte pour environ 40 % de la masse totale hydrique de l'organisme. Elle a pour principale caractéristique sa richesse en sodium. L'eau intracellulaire se caractérise par sa richesse en potassium.
Le bilan des entrées et des sorties d'eau doit être équilibré. Les mouvements de l'eau sont principalement liés aux mouvements des électrolytes.

| Hyperhydratations | isotoniques | hypotoniques | hypertoniques |
|---|---|---|---|
| Augmentation du volume des secteurs extra- et/ou intracellulaires | Augmentation de l'eau = augmentation du sodium | Augmentation de l'eau >> augmentation du sodium | Augmentation de l'eau << augmentation du sodium |

| Déshydratations | isotoniques | hypotoniques | hypertoniques |
|---|---|---|---|
| Diminution du volume des secteurs extra- et/ou intracellulaires | Diminution de l'eau = diminution du sodium | Diminution de l'eau << diminution du sodium | Diminution de l'eau >> diminution du sodium |

Le sodium est le principal cation du secteur extracellulaire. L'hyponatrémie se définit pour une concentration plasmatique inférieure à 134 mmol/L. Elle est liée à une diminution de l'osmolalité plasmatique (hypotonicité plasmatique). Elle reflète généralement une rétention d'eau par le rein, le plus souvent due à une sécrétion persistante d'arginine vasopressine (AVP).
L'hypernatrémie se définit pour une concentration plasmatique de sodium supérieure à 146 mmol/L. Elle induit une déshydratation intracellulaire et indique une perte d'eau libre. Les causes d'hypernatrémie sont essentiellement des pertes d'eau non compensées, un diabète insipide, des lésions affectant les centres régulateurs de la soif et de l'osmorégulation, des transferts intracellulaires avec pertes d'eau et des surcharges en sodium.
Les chlorures sont les principaux anions du secteur extracellulaire. L'hypochlorémie se définit pour une concentration des chlorures plasmatiques inférieure à 95 mmol/L. Les principales causes d'hypochlorémie sont les déficits en sels ou les dilutions et l'acidose métabolique. Les hyperchlorémies se définissent pour une concentration des chlorures plasmatiques supérieure à 110 mmol/L. Les principales causes sont les hypernatrémies des déshydratations cellulaires ou globales et les désordres de l'équilibre acide-base.

# Les diabètes insulino- et non insulinodépendants

V. ANNAIX, Pr A. THUILLIER[†]
Laboratoire de biochimie, UFR sciences pharmaceutiques et ingénierie de la santé, Angers.

*Le diabète sucré, connu depuis l'Antiquité, est décrit alors comme une maladie « au cours de laquelle la chair et les membres fondent dans les urines ». Au XX^e siècle seulement apparaît une ébauche de classification clinique en diabètes « gras » et « maigre », classification qui a récemment évolué à la suite de l'analyse des études effectuées ces dernières décennies (DCCT, UKPDS)[1]. Si les progrès dans le domaine de la génétique permettent une meilleure compréhension de la maladie, un diagnostic plus précoce de celle-ci et une surveillance mieux adaptée permettront une prise en charge plus rapide du patient avec une diminution des complications invalidantes apparaissant au long cours. Il y a plus de 150 millions de sujets diabétiques de par le monde, dont environ 2 millions en France où 1 % de la population n'est pas encore dépisté. Les critères actuels retenus pour la classification ne sont plus fondés sur le traitement mais sur la pathogénie. La prévalence en France est supérieure à 3,5 % dans la population générale et à 11 % chez les personnes de plus de 65 ans, prévalence en augmentation en raison du vieillissement de la population et de l'augmentation de l'obésité. En France, un doublement du nombre des diabétiques est attendu d'ici 2020. Le diabète sucré est défini comme un groupe de maladies métaboliques caractérisées par une élévation anormale et chronique de la glycémie. La limite supérieure de la glycémie chez un sujet normal et les valeurs trouvées chez des sujets diabétiques sont quelquefois difficiles à apprécier mais, au-delà d'un certain seuil, l'hyperglycémie apparaît associée aux complications du diabète sucré. Le diagnostic de diabète sucré est maintenant porté sur une glycémie à jeun supérieure à 7,0 mmol/L, soit 1,26 g/L.*

# I. Normes de diagnostic et de classification du diabète sucré

La classification proposée par l'OMS en 1980, révisée une première fois en 1985, a de nouveau été revue en 1999 d'après des critères proposés en 1997 par l'American Diabetes Association (ADA). Pour des raisons liées à la faisabilité de l'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO) et son interprétation par rapport à la glycémie à jeun, les anciens critères se sont révélés imparfaits. Les nouveaux critères prennent en compte le risque important de microangiopathies. Les critères de diagnostic et les bases de la classification portent essentiellement sur l'abaissement du seuil de la glycémie à jeun pour définir le diabète sucré. Ainsi le *critère de diagnostic* du diabète sucré (*tab. 1*) est-il principalement la *glycémie à jeun* (pendant plus de huit heures) *supérieure à 7,0 mmol/L, soit 1,26 g/L*, *vérifiée* sur un autre prélèvement. Cependant, des symptômes évocateurs de la maladie (soif, polyurie, fatigue, amaigrissement malgré un appétit conservé ou même accru) avec glycémie supérieure à 11,1 mmol/L (> 2,00 g/L) quelle que soit l'heure du prélèvement ou deux heures après l'administration de glucose par voie orale, sont aussi à prendre en compte en alternative. Enfin, les sujets présentant une glycémie à jeun comprise entre 6,1 et 7,0 mmol/L (1,10 à 1,26 g/L) sont hyperglycémiques non diabétiques.

1. DCCT : Diabetes control and complications trial research group.
UKPDS : United Kingdom prospective diabetes study.

**Tableau 1.** Comparaison des critères utilisés pour le diagnostic de diabète

| | Glycémie à jeun | Glycémie 2 heures après la charge en glucose |
|---|---|---|
| Sujet normal | < 6,1 mmol/L<br>< 1,10 g/L | < 7,8 mmol/L<br>< 1,40 g/L |
| Intolérance au glucose | | 7,8 à 11,1 mmol/L<br>1,40 à 2,00 g/L |
| Impaired fasting glucose<br>Hyperglycémie non diabétique | 6,1 à 7,0 mmol/L<br>1,10 à 1,26 g/L | |
| Diabète sucré | ≥ 7,0 mmol/L<br>≥ 1,26 g/L | ≥ 11,1 mmol/L<br>≥ 2,00 g/L |

La classification étiologique comprend :

- le diabète de type 1, avec destruction des cellules β des îlots de Langerhans conduisant généralement à une insulinopénie totale. Il peut être auto-immun ou idiopathique ;
- le diabète de type 2, avec insulinorésistance associée ou non à une insulinopénie relative ;
- les diabètes secondaires à des atteintes pancréatiques, endocriniennes, iatrogènes, infectieuses ou par anomalie génétique ;
- le diabète gestationnel.

Les mécanismes physiopathologiques, en revanche, restent au nombre de deux : insulinodéficience et insulinorésistance.

*Remarque* : les valeurs définissant actuellement le diabète sont essentiellement fondées sur les risques de rétinopathie et de néphropathies et moins sur les risques de complications cardiovasculaires. Différentes études récentes montrent que les seuils de glycémie semblent différents pour les deux types de risque. Ainsi un seuil maximal de glycémie normale à 1,0 g/L (5,5 mmol/L) pourrait être adopté afin de prendre en compte l'insulinorésistance.

## II. Régulation de la glycémie

*Revoir question régulation de la glycémie dans ce même volume.*

La glycémie est une valeur dépendant de la synthèse de glucose (glycogénolyse, néoglycogenèse) et de son oxydation dans les tissus périphériques, sous la régulation d'un facteur hypoglycémiant, l'insuline, et de plusieurs facteurs hyperglycémiants, adrénaline, glucagon, cortisol, STH.

## III. Aspects physiopathologiques des diabètes

Le diabète est une maladie multifactorielle dans laquelle interviennent des facteurs génétiques et environnementaux. La concordance entre jumeaux monozygotes est de 35 à 70 % pour le diabète de type 1 et est encore supérieure dans le diabète de type 2 (75 à 90 %). Malgré les nombreux travaux, les gènes ne sont pas tous con-

nus, pas plus que les facteurs d'environnement. Il faut cependant remarquer que, parmi les autres types de diabète, certains sont monogéniques (environ 10 %). De la sorte, des modifications dans les gènes qui codent pour les protéines de l'homéostasie glucidique ont été mises en évidence (comme la glucokinase dans le diabète MODY – *maturity onset diabetes of the young*) ou dans le gène de l'insuline ou de son récepteur.

## A. Diabète de type 1 (insulinodépendant)

En France, il touche 10 à 15 % de l'ensemble des sujets diabétiques connus, soit environ 200 000 sujets. Il se rencontre surtout chez le sujet jeune (enfant, adolescent) avec un pic maximum de fréquence d'apparition entre 10 et 14 ans et une prédominance pour le sexe masculin, mais il peut être diagnostiqué à tout âge. Ce diabète résulte d'une destruction progressive et sélective des cellules β des îlots de Langerhans entraînant une carence absolue en insuline, d'où une lipolyse et une cétogenèse intenses, surtout chez le sujet jeune. L'hyperglycémie apparaît lorsqu'il ne reste plus que 10 à 20 % de cellules fonctionnelles. Autrefois dénommé diabète « maigre », il tend spontanément à la cétose et nécessite un traitement par l'insuline. Mieux le traitement sera conduit, mieux la glycémie sera maîtrisée et moins les complications à terme seront nombreuses.

### 1. Génétique du diabète de type 1

Dès les années 1970, il est montré que la fréquence de certains allèles est supérieure chez les diabétiques. Au moins dix gènes sont en cause. Globalement, la région HLA contribue pour environ 85 % au risque familial de développer un diabète. Le risque principal se situe sur le chromosome 6, notamment par les gènes du système HLA classe II, DR3 et/ou DR4. L'association des deux est fréquente dans la population diabétique (7 % contre seulement 1 % dans la population générale) et le risque relatif de 20 à 40. Parmi les gènes de classe I du système HLA, sont reconnus les allèles B8, B15 et B18. Dans le système DQA et DQB, certains allèles sont dits « de susceptibilité » et d'autres sont « protecteurs ». Un gène est aussi connu dans la région du gène de l'insuline. Le risque de survenue d'un diabète de type 1 est de 3 à 5 % quand l'un des parents est atteint.

### 2. Facteurs auto-immuns

Le diabète de type 1 auto-immun dépendant des lymphocytes T est le plus fréquent et, dans 90 % des cas de diabète de découverte récente chez l'enfant, des autoanticorps sont détectables : anti-îlots de Langerhans, anti-insuline, antiglutamate acide décarboxylase. Ces anticorps peuvent être détectés jusqu'à cinq ans avant le début clinique de la maladie chez les jumeaux monozygotes de patients diabétiques connus. Ils sont les marqueurs du phénomène. Des facteurs d'environnement sont certainement impliqués dans le déclenchement de la réaction auto-immune : alimentation dans le gradient nord-sud (Finlande-France), virus (rubéole, coxsackie B, CMV) induisant la sécrétion d'interféron γ.

### B. Diabète de type 2

C'est le plus fréquent des diabètes communs, environ 90 % des cas. En France, il touche 1,8 million de sujets. La prévalence est variable dans le monde (faible en France, environ 3 %, Indiens pima, 50 %, île Maurice, 15 %) et elle augmente avec l'âge. C'est une maladie préoccupante du point de vue de la santé publique du fait des risques cardiovasculaires importants et du peu de symptômes d'appel. On estime actuellement qu'en France 600 000 diabétiques de type 2 s'ignorent. Ce type de diabète est la conséquence d'une insulinorésistance associée à une insulinopénie éventuelle. L'insulinorésistance survient sur un terrain génétique de prédisposition. Vis-à-vis du glucose, elle diminue son utilisation musculaire et augmente sa production hépatique. Les facteurs à rechercher sont l'obésité, la sédentarité, l'âge, l'hypertension artérielle et le bilan lipidique perturbé (cholestérol et triglycérides augmentés). Il atteint surtout les sujets âgés de 40 à 65 ans, le plus souvent obèses (50 à 80 % des cas). Le mode de révélation de cette maladie est souvent la découverte d'une atteinte dégénérative (30 % au moment du diagnostic, actuellement) ou la présence d'infections à répétition. Le diabète de type 2 ne conduit pas spontanément à la cétose et peut être corrigé par un régime hypocalorique et éventuellement par l'administration *per os* de médicaments hypoglycémiants.
La physiopathologie de ce type de diabète est encore plus mal connue que celle du diabète de type 1. À l'heure actuelle, des mutations dans des gènes candidats sont décrites : gène de la glucokinase, gène du récepteur au glucagon, gène de l'*insulin receptor substrate*. Cependant, un mode unique de transmission ne peut être décrit et fait considérer le diabète de type 2 comme une maladie multifactorielle avec l'intervention de conditions environnementales (sédentarité, alimentation).

### C. Note concernant le diabète gestationnel

Toute intolérance au glucose apparue ou découverte au cours de la grossesse définit le diabète gestationnel. Son dépistage est actuellement proposé en France à toute femme enceinte (voir « *Épreuve d'hyperglycémie par voie orale (HPGO)* »). Ce type d'anomalie nécessite le plus souvent une insulinothérapie associée à des mesures diététiques. Pour la plupart des femmes, cette hyperglycémie est transitoire. Pour d'autres, la grossesse est le facteur déclenchant d'un diabète vrai permanent, latent jusque-là. Il est donc nécessaire de préciser la tolérance au glucose chez ces femmes six semaines après l'accouchement.

## IV. Diagnostic biologique du diabète sucré

Le diabète sucré est donc défini comme un groupe de maladies métaboliques caractérisées par une élévation anormale et chronique de la glycémie. Le diagnostic de diabète sucré est maintenant porté sur une glycémie à jeun supérieure à 7,0 mmol/L, soit 1,26 g/L. Le test biochimique de diagnostic sera donc la détermination de la glycémie. D'autres examens biochimiques pourront être mis en œuvre au moment du diagnostic : glycosurie, dosage de l'insuline et du peptide-C. Dans certains cas, l'épreuve d'hyperglycémie provoquée par voie orale pourra servir au diagnostic.

## A. Glycémie

S'il s'agit du test de diagnostic, ce dosage est aussi couramment prescrit dans le cadre d'un bilan systématique de dépistage (selon les critères suivants : sujets âgés de plus de 45 ans, obésité, hypertension, anomalie lipidique, famille de diabétiques, antécédent de diabète gestationnel ou naissance d'un enfant de plus de 4 kg) ou pour la surveillance du diabète.

*Définition* : reflet instantané, la glycémie correspond au taux de glucose circulant.

*Prélèvement* chez un sujet à jeun depuis dix heures, sauf prescription contraire (glycémie post-prandiale) :

- le plus souvent, prélèvement de sang veineux recueilli sur anticoagulant (héparine, plus rarement oxalate) pouvant être associé à un antiglycolytique (fluorure ou iodoacétate). En effet, la glycémie obtenue à partir d'un prélèvement effectué sur anticoagulant seul décroît très rapidement. À la température du laboratoire, la baisse peut atteindre 10 % par heure, conséquence de la glycolyse induite par les éléments figurés du sang ;
- des microprélèvements de sang artériolo-capillaire effectués au bout du doigt (autocontrôle glycémique) ou au talon (chez le jeune enfant). Dans ce cas, les valeurs trouvées seront plus élevées, surtout si le prélèvement n'est pas fait chez un sujet rigoureusement à jeun.

*Méthodes de dosage* (la répartition des méthodes mentionnées se réfère aux résultats du Contrôle national de qualité 1998, il n'y a pas de données diffusées plus récentes) :

- les méthodes réductimétriques vis-à-vis des sels de métaux lourds (non spécifiques) sont actuellement abandonnées ;
- les méthodes furfuraliques (à l'orthotoluidine), également non spécifiques du glucose, donnent de bons résultats et sont encore utilisées par moins de 2 % des laboratoires ;
- les méthodes enzymatiques sont utilisées à l'heure actuelle par plus de 98 % des laboratoires. Elles sont spécifiques du glucose et font appel à diverses enzymes :
  - la *glucose oxydase* (85 %) : en présence de cette enzyme et d'oxygène moléculaire, le glucose est transformé en gluconate avec formation d'eau oxygénée. Diverses techniques permettent alors de doser soit l'oxygène moléculaire consommé au cours de la réaction (2,5 %), soit l'eau oxygénée formée, en faisant appel à une peroxydase et à un chromogène (phénol aminoantipyrine : PAP-Trinder), avec mesure photométrique d'absorption moléculaire (68 %) ou réflectométrique (lumière réfléchie : 13 %),
  - l'*hexokinase* (12 %) et la *glucose déshydrogénase* (1 %) : ces deux enzymes utilisent un coenzyme nicotinique ($NAD-NADH_2$) comme indicateur de réaction. Elles sont beaucoup moins utilisées que la glucose oxydase (coût de revient plus élevé).

*Valeurs usuelles* : chez l'adulte à jeun, 4,2 à 6,1 mmol/L (0,76 à 1,10 g/L) par une méthode enzymatique. Les taux sont légèrement plus élevés par les méthodes non spécifiques.

*Variations physiologiques* : chez l'enfant et le nouveau-né, la valeur est plus faible. Au cours de la grossesse, le taux de la glycémie à jeun est abaissé.

*Cycle glycémique* : après un repas (glycémie post-prandiale), la glycémie s'élève pendant une période n'excédant pas deux ou trois heures. Chez un adulte de moins

de 50 ans, la glycémie deux heures après le repas principal de la journée est inférieure à 7,8 mmol/L (1,40 g/L). La glycémie post-prandiale s'élève de 0,55 mmol/L (0,10 g/L) par décennie après 50 ans. Alcool, tabac, stress, froid l'augmentent. Ce cycle (valeur à 14 heures et/ou 17 heures) est un examen complémentaire dans le suivi de la maladie chez le diabétique de type 2 et renseigne sur l'évolution de ce diabète, notamment sur les capacités sécrétoires d'insuline.
*Diagnostic du diabète* : il est porté sans ambiguïté si la glycémie à jeun est supérieure à 7,0 mmol/L (1,26 g/L), résultat confirmé par au moins deux examens, sur un prélèvement à jeun et sans erreur de laboratoire ! Dans la zone intermédiaire (6,1 à 7,0 mmol/L, soit 1,10 à 1,26 g/L), 10 % des sujets deviendront diabétiques et doivent être surveillés.

## B. Glycosurie

Elle est surtout effectuée dans le cadre de dépistage de masse.
*Définition* : la glycosurie correspond au taux de glucose urinaire et renseigne sur le passé, consécutivement aux variations de la glycémie depuis la dernière miction.
*Prélèvement* : urines fraîches provenant d'une miction ou urines de 24 heures sans addition de conservateur.
*Recherche* : elle est totalement abandonnée par la méthode réductimétrique de Fehling. Actuellement, elle ne se réalise que par l'emploi de bandelettes réactives à la glucose oxydase (recherche seule ou associée à d'autres paramètres : pH, protéines, acétone). Il existe cependant des réactions faussement positives, notamment avec les oxydants forts (eau de Javel, liqueur de Dakin) et quelques interférences médicamenteuses (salicylés, L-dopa, isoniazide, vitamine C).
*Dosage* : il s'effectue par les mêmes techniques que pour la glycémie.
*Valeurs usuelles* : physiologiquement, aucune glycosurie ne doit être mise en évidence chez un sujet à jeun. En effet, le glucose est une substance à « seuil rénal » (Tm G) et n'est pas normalement éliminé par voie urinaire si la valeur de la glycémie est inférieure à 10 mmol/L (1,80 g/L). Il faut néanmoins se méfier de la possibilité d'abaissement du seuil rénal du glucose, soit permanent (diabète rénal : glycémie normale, glycosurie positive), soit transitoire (grossesse), et donc ne jamais établir un diagnostic de diabète sur le seul critère de la présence de glucose dans les urines. Par ailleurs, le seuil rénal d'un sujet diabétique peut varier et il lui est indispensable d'établir son propre seuil rénal.

## C. Épreuve d'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO)

Nécessaire pour un diagnostic d'intolérance au glucose (classification OMS), cette épreuve dynamique d'exploration est destinée à mettre en évidence des troubles du métabolisme glucidique que les méthodes statiques d'exploration (glycémie, glycosurie) ne permettent pas de déceler. Ce n'est pas l'épreuve de référence de diagnostic du diabète pour l'ANAES (2003), mais l'OMS propose d'associer ce test pour une confirmation du diabète. Cette épreuve est fondée sur l'élévation de la glycémie de façon transitoire après un apport de glucose par voie orale (épreuve

de charge). Différents protocoles ont été décrits mais, actuellement, la tendance est la standardisation de cette épreuve.
*Précautions à prendre avant la réalisation de l'épreuve* : respect d'un régime glucidique équilibré (au moins 200 g d'hydrates de carbone par jour) dans les trois jours qui précèdent celle-ci, proscription dans la mesure du possible des médicaments qui diminuent la tolérance au glucose (corticoïdes, diurétiques, œstroprogestatifs, inhibiteurs calciques, bêtabloquants, etc.).
*Technique la plus classique* : administration par voie orale d'une charge de 75 g de glucose, chez un sujet à jeun depuis au moins dix heures et au maximum seize heures. Pendant toute la durée de l'épreuve, le sujet doit rester assis ou allongé et ne pas fumer. Les prélèvements en vue de la détermination de la glycémie seront effectués juste avant l'épreuve (glycémie de base), puis toutes les demi-heures pendant trois heures. La recherche d'une glycosurie peut être effectuée une et deux heures après la charge de glucose.
*Résultats* : différents types de courbe peuvent être obtenus (*figure 1*). Chez un sujet sain, la première partie de la courbe montre une augmentation progressive de la glycémie par absorption intestinale du glucose et diffusion sanguine. De façon parallèle mais décalée, il y a sécrétion d'insuline qui limite le maximum de cette courbe. La deuxième partie met en évidence l'effet de l'insuline par captation cellulaire du glucose.

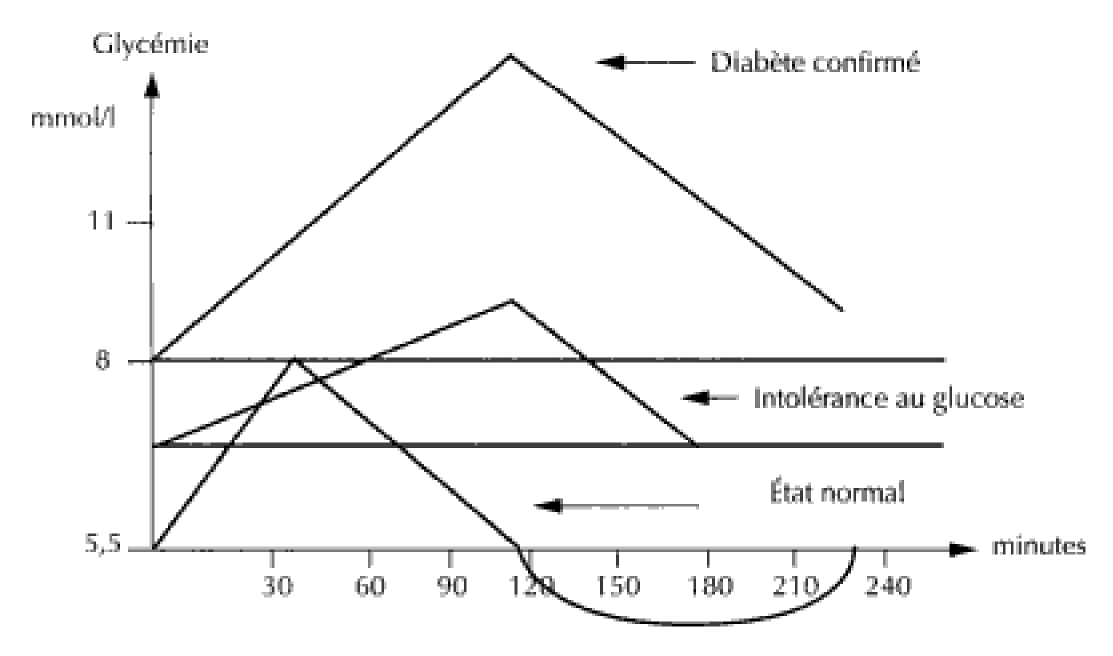



**Figure 1.** Hyperglycémie par voie orale

Certains critères sont retenus par l'OMS (1985) pour *standardiser cette épreuve* :
- charge de glucose de 75 g chez l'adulte et de 1,75 g/kg de poids chez l'enfant, administrée en moins de 5 min avec 250 ml d'eau ;
- méthode de dosage du glucose par une technique à la glucose oxydase ;
- dosages de glycémie réalisés avant la charge en glucose et deux heures après ;
- critères d'interprétation des résultats (sang veineux) : *tableau 1*.

Cette interprétation peut être légèrement différente chez l'enfant, la femme enceinte et les personnes de plus de 50 ans.

*Note concernant le test de O'Sullivan*
C'est un test de charge orale (50 g de glucose), effectuable à n'importe quel moment de la journée avec dosage de la glycémie une heure après, afin de dépister un diabète gestationnel. Il concerne toutes les femmes enceintes (24 à 28 semaines d'aménorrhée). Celles qui présentent un facteur de risque de diabète (obésité, antécédent familial ou personnel) peuvent être dépistées plus tôt. Le test de dépistage est considéré comme positif si la glycémie de la première heure est > 7,2 mmol/L, soit 1,30 g/L. Il est alors nécessaire de mettre en œuvre l'HGPO avec 100 g de glucose. Un taux au dépistage > 11 mmol/L, soit 2 g/L, induit le diagnostic d'emblée. Dès le diagnostic posé, ces femmes doivent être prises en charge par un diabétologue.

## D. Insuline et peptide-C

### 1. Insuline

C'est la première hormone qui a été dosée par une méthode radioimmunologique dès 1960. Actuellement, son dosage permet une meilleure compréhension du diabète sucré, tant sur le plan diagnostique que pour le suivi de la maladie. Il est aussi utilisé dans l'exploration des hypoglycémies.
*Prélèvement* : sérum ou plasma recueilli sur EDTA ou héparine, non hémolysé.
*Méthodes de dosage* : les techniques font appel à des anticorps polyclonaux (radioimmunologie RIA) ou monoclonaux (techniques immunométriques IRMA ou IEMA). Les méthodes RIA sont les plus anciennes et les moins spécifiques (croisement avec les proinsulines, les insulines animales ou humaines modifiées). La présence d'autoanticorps anti-insuline (dans le prélèvement) entraîne des résultats erronés (défaut ou excès selon la technique).
*Valeurs usuelles* : pour un sujet à jeun, les valeurs usuelles varient selon la technique utilisée : généralement < 15 mU/L. Les insulinémies à jeun peuvent être très basses (inférieures à la limite de détection de la technique). Les enfants ont des taux inférieurs à ceux de l'adulte.
*Intérêt physiopathologique* : exploration de la sécrétion résiduelle d'insuline et du degré d'insulinorésistance, généralement au cours d'épreuves de stimulation, comme l'HGPO. L'interprétation doit toujours se faire de façon associée à la mesure de la glycémie.
*Chez un sujet normal*, la courbe de sécrétion d'insuline est légèrement décalée vers la droite par rapport à la courbe de la glycémie. Cela traduit la réponse sécrétoire d'insuline au stimulus glucidique, mais n'apprécie pas la dégradation par le foie de l'insuline secrétée.
*Chez le sujet diabétique de type 1*, le taux d'insuline est bas et non augmenté au cours de l'HGPO. Ce dosage est cependant peu effectué chez ces patients.
*Chez le sujet diabétique de type 2*, le taux d'insuline est à peu près normal mais est moins augmenté lors de l'HGPO que la glycémie ne le laisse prévoir. Son évaluation est un élément décisionnel pour le passage à l'insuline.

### 2. Peptide-C

Le clivage de la proinsuline dans les cellules β des îlots de Langerhans libère une molécule d'insuline et un peptide de connexion (peptide-C), déversés dans le sang en quantités équimoléculaires. Le peptide-C n'est pas retenu au niveau du foie et subit la filtration glomérulaire sans réabsorption tubulaire : retrouvé en partie intact dans les urines, il peut y être évalué. Son dosage reflète la sécrétion endogène d'insuline, donc permet d'apprécier la capacité fonctionnelle résiduelle de la sécrétion d'insuline chez un sujet diabétique sous insulinothérapie.

*Prélèvement* : sérum le plus fréquemment, urines de 24 heures.

*Méthodes de dosage* : immunodosages par compétition ou sandwich, avec des anticorps polyclonaux ou monoclonaux. Certaines interférences sont mentionnées avec la proinsuline et certains autoanticorps.

*Intérêt physiopathologique* : les indications sont superposables à celles du dosage de l'insuline et l'interprétation doit toujours se faire de façon associée à la mesure de la glycémie :

- dosage isolé chez un sujet à jeun : d'interprétation difficile, notamment en cas d'insuffisance rénale ;
- valeurs usuelles pour une glycémie normale : sérum < 1,6 nmol/L ; urines < 40 nmol/j ;
- dosage après stimulation : repas d'épreuve, HGPO, test au glucagon, pour suivre :
  - un diabète de type 1 et les capacités de sécrétion résiduelle,
  - un diabète de type 2 et la fonction pancréatique, ainsi que l'éventuel passage à une carence insulinique,
  - une hypoglycémie en relation avec une tumeur sécrétante d'insuline.

Lors de l'HGPO, les valeurs sont augmentées mais le pic est retardé par rapport à celui de l'insuline et le retour au taux basal est plus lent.

## V. Autosurveillance du sujet diabétique

Le sujet diabétique doit effectuer lui-même une surveillance continue de sa glycémie. Elle concerne en premier lieu le sujet diabétique traité par insuline. Elle est effectuée plusieurs fois par jour afin d'adapter correctement les doses d'insuline en fonction des résultats de la glycémie et de l'activité prévue pour la journée. Cette autosurveillance, longtemps fondée uniquement sur la recherche de glucose urinaire, est supplantée par le dosage de la glycémie capillaire. En effet, ce dosage apprécie le taux de glucose au temps présent et non au temps passé comme la glycosurie. Il s'effectue sur un microprélèvement sanguin pris au bout du doigt (microlancettes et autopiqueur) et par utilisation de bandelettes réactives à la glucose oxydase. L'intensité de la coloration obtenue peut être lue sur un lecteur (mesure par réflectométrie ou potentiométrie). Les appareils commercialisés (liste sur le site de l'AFSSAPS) sont de plus en plus petits et fiables. Ils permettent une lecture en moins d'une minute. Quelques précautions particulières doivent cependant être prises vis-à-vis du matériel (nettoyage) et du sang : quantité (suffisante)

et qualité (mains propres). Par ailleurs, ces petits appareils n'intègrent pas encore tous une calibration.
Le contrôle régulier de la glycémie capillaire est un élément essentiel du traitement du diabète. Une bonne surveillance permet d'instaurer un traitement de qualité pour un équilibre glycémique correct et donc de prévenir ou retarder le développement des complications dégénératives qui représentent le danger à long terme du diabète. L'autosurveillance est incontournable dans le suivi d'un traitement par insuline. Elle est une aide chez le diabétique de type 2, même si sa place n'est pas bien définie. Cependant, une minorité des patients sous insuline utilisent encore ces appareils pour une adaptation instantanée du traitement. Actuellement, des appareils de mesure continue de la glycémie apparaissent sur le marché, et demandent encore à être améliorés.

## VI. Surveillance biologique du traitement

Au cours de l'évolution du diabète, deux types de complications sont à redouter : la microangiopathie due à l'hyperglycémie et la macroangiopathie liée à l'hyperglycémie et à l'insulinorésistance, associées au moins à des facteurs de risque cardiovasculaire reconnus (hypertension artérielle, tabac, hypercholestérolémie, etc.). Ces complications semblent rares pour des valeurs de la glycémie < 7,0 mmol/L, soit 1,26 g/L. L'hyperglycémie chronique du diabétique non ou mal traité entraîne le phénomène de glycation de toutes les protéines de l'organisme (protéines circulantes, de membrane ou de structure), au niveau de tous les tissus (notamment nerfs périphériques, reins, yeux). Ce phénomène est à l'origine des complications médicales du diabète, en particulier par diminution de la déformabilité des hématies, de la modification de charge des membranes basales des glomérules (à l'origine de néphropathies), du changement de conformation des protéines du cristallin (dont la conséquence est la cataracte diabétique), etc. 50 % des cécités, 25 % des dialyses rénales et 5 % des amputations se rencontrent chez le sujet diabétique. Ce phénomène correspond à la fixation d'ose sur des fonctions amines de protéines ($NH_2$ terminal, $\varepsilon NH_2$ de lysine) par un processus non enzymatique (réaction de Maillard). Chez le diabétique, ce processus est augmenté du fait de l'hyperglycémie. Deux marqueurs biologiques cumulatifs permettent de suivre la conduite d'un traitement, donc de contrôler la régulation glycémique :

- les hémoglobines glyquées, surtout l'hémoglobine A1c, marqueur à long terme de l'équilibre glucidique (6 à 8 semaines) ;
- les protéines glyquées ou fructosamines, marqueur à plus court terme (2 à 3 semaines).

De nouveaux marqueurs, les produits de glycation avancée (AGE's = *advanced glycation end products*), dont la pentosidine, sont actuellement à l'étude. Ces produits dérivés de molécules à longue demi-vie (> 8 semaines) sont à l'origine d'un stress oxydant et des complications rénales du diabète.

## A. Hémoglobines glyquées et hémoglobine A1c

### 1. Nature

Dès 1968, l'hétérogénéité de l'hémoglobine humaine est montrée par chromatographie, par fixation post-traductionnelle de résidus glucidiques : une hémoglobine particulière existe en quantité plus importante chez le sujet diabétique que chez l'adulte sain. C'est une molécule d'hémoglobine A1 ($\alpha 2\ \beta 2$) sur laquelle est fixée une molécule de glucose (HbA1c). Elle fait partie de plusieurs fractions glyquées séparables par isofocalisation. La formation de l'HbA1c se réalise en deux étapes :

- une étape réversible et rapide, dépendant de la glycémie et aboutissant à la formation de Hb pré-A1c, par la réaction de l'aldéhyde du glucose avec le $NH_2$ de la valine terminale de la chaîne β de l'hémoglobine (base de Schiff instable) ;
- une étape irréversible et lente, conduisant à la formation d'une cétoamine stable par réarrangement d'Amadori.

Cette réaction est post-translationnelle, n'est pas catalysée par un système enzymatique et est proportionnelle aux taux de la glycémie. Lors des déséquilibres glycémiques, c'est la fraction HbA1c qui varie le plus.

### 2. Intérêt de la mesure de l'HbA1c

La formation d'hémoglobines glyquées est un processus permanent, qui entretient un taux physiologique d'HbA1c. L'intervalle de référence est fixé de 4 à 6 % de l'Hb totale. Chez le sujet diabétique non équilibré par un traitement, l'augmentation du taux d'HbA1c sera proportionnelle aux épisodes hyperglycémiques. La mesure de ce paramètre présente un intérêt tant chez le diabétique de type 1 que chez celui de type 2. De plus, une corrélation a été établie entre l'équilibre glycémique évalué par l'HbA1c et l'apparition de complications dégénératives : une augmentation de 10 % du risque de mortalité cardiovasculaire pour une augmentation de 1 % de l'HbA1c (soit 0,30 g/L de glycémie). Inversement, une diminution de 1 % de l'HbA1c entraînant une diminution de 30 % de la microangiopathie (étude UKPDS).

*Prélèvement* : sang total recueilli sur anticoagulant (EDTA, héparine ou citrate) pouvant être conservé quelques jours à + 4 °C, avec préparation manuelle ou automatique de l'hémolysat (hémolyse douce à pH acide).

*Méthodes de dosage de l'HbA1c* : elles varient selon que l'on dose spécifiquement l'HbA1c (méthodes séparant selon la charge – échange d'ions, électrophorèse – et méthodes immunologiques) ou les Hb glyquées totales (chromatographie d'affinité), ces dernières devant être abandonnées.

- Méthodes chromatographiques sur résines échangeuses de cations : techniques les plus répandues. Elles sont fondées sur la différence de comportement à pH neutre entre l'Hb glyquée (charge nette plus négative) et non glyquée vis-à-vis des résines chargées négativement et permettent une quantification spectrophotométrique (à 415 nm) des différentes formes d'hémoglobines. Ces techniques nécessitent la maîtrise parfaite des différents paramètres analytiques (pH, force ionique, température, taille de la colonne, etc.). L'automation par chromatographie haute ou basse pression se développe de plus en plus ces dernières années, apporte précision et rapidité mais nécessite un investissement lourd (HPLC).

- Méthodes électrophorétiques en gel d'agarose à pH 6,1 avec intégration à 415 nm.
- Méthodes immunologiques avec des anticorps monoclonaux : inhibition de l'agglutination (différents appareils de biologie délocalisée utilisent ce principe) ou immunoturbidimétrie en phase homogène.

Actuellement, les méthodes proposées sur le marché ne sont pas équivalentes et différents groupes de travail mettent en place un processus international de standardisation, les techniques commercialisées devant être reliées aux méthodes recommandées par les sociétés scientifiques internationales. Toutes les études ont été fondées sur des valeurs de HbA1c avec le standard NGSP (technique « chromatographie d'échange d'ions ») et ont permis l'établissement des objectifs actuels. Un autre standard « IFCC avec hexapeptide glyqué et HPLC-SM ou électrophorèse capillaire » est actuellement approuvé et une relation entre ces deux standards a été établie. Cette relation demande cependant à être validée au fil du temps, les valeurs de HbA1c trouvées avec ce deuxième standard étant plus faibles.

## 3. Résultats chez le sujet diabétique

L'utilisation de l'HbA1c à l'exclusion de tout autre paramètre a été retenue comme paramètre de suivi de l'équilibre glycémique, avec comme valeur de référence 4 à 6 % de l'hémoglobine totale. Son évaluation permet d'identifier les patients mal équilibrés et de modifier le schéma thérapeutique. Les objectifs de traitement sont cependant à adapter à chacun :

- diabète de type 1 : il a été montré qu'un délai d'une semaine est nécessaire pour observer une baisse du taux de HbA1c sous l'effet de la thérapeutique. Dans le cadre de la surveillance, un dosage tous les deux mois semble souhaitable. L'objectif du traitement est d'obtenir une HbA1c inférieure à 7 % en évitant les hypoglycémies trop sévères ;
- diabète de type 2 : le taux de HbA1c ne baisse qu'après trois semaines de traitement environ et sa détermination ne devait donc être faite que trois fois par an (RMO : pas plus de tous les trois mois). L'objectif de traitement chez ces patients est avant tout la prévention du risque vasculaire et l'adaptation des objectifs glycémiques varie en fonction de l'âge du patient : ainsi est recommandée une HbA1c inférieure ou égale à 6 % avant 50 ans, à 7 % avant 60 ans, à 8 % avant 70 ans.

Actuellement, le dosage de HbA1c n'est pas un outil de dépistage ou de diagnostic du diabète.

## 4. Interférences et variations physiologiques

Les interférences sont variables selon les techniques, par exemple :

- hémoglobinopathies (thalassémies, hémoglobinoses S, C, D), Hb F en grande quantité ;
- durée de vie des hématies plus courte : hémolyses de causes variées.

Des variations sont détectables lors de la grossesse (augmentation au premier trimestre, puis diminution) ou lors d'hyperlipidémies.

Enfin, des difficultés d'interprétation sont à noter chez l'insuffisant rénal par augmentation de la fraction d'hémoglobine carbamylée obtenue par fixation de résidus de cyanate (provenant de la dissociation spontanée de l'urée plasmatique) sur les chaînes $\alpha$ et $\beta$ de l'hémoglobine.

## B. Protéines sériques glyquées (ou fructosamines)

En fait, la fixation non enzymatique du glucose se fait sur toutes les protéines. Ces protéines sériques glyquées sont dénommées « fructosamines ». Cette fixation est fonction du taux sanguin de glucose et résulte de la condensation d'un groupement réducteur osidique avec un groupement aminé protéique. Par conversion d'Amadori, l'aldimine formée donne une cétoamine stable. Ainsi, le glucose donne la fructosamine. Pour une même protéine, plusieurs sites de fixation sont possibles : pour l'albumine, 58 potentiels, 5 effectifs. Une fois glyquées, les protéines le restent jusqu'à leur catabolisme.

*Prélèvement* : sang veineux recueilli sur EDTA.

*Méthode de dosage* : elle est fondée sur le pouvoir réducteur des cétoamines en milieu alcalin. Sont dosés principalement l'albumine, les lipoprotéines, le fibrinogène. La réduction du bleu de nitrotétrazolium en milieu alcalin conduit à la formation de formazan, mesuré par photométrie. Une hémolyse importante du prélèvement, un taux de bilirubine élevé interfèrent avec le dosage. En revanche, le taux des fructosamines peut être faussement abaissé lors des hypoprotéinémies sévères et des renouvellements protéiques importants (inflammation, hyperthyroïdie).

*Résultat* : l'intérêt de leur détermination réside principalement lors de changements de thérapeutiques, à la suite d'une décompensation métabolique (inertie trop grande de HbA1c), dans la surveillance du traitement du diabète de la femme enceinte et lors de la présence d'hémoglobines anormales. Cependant, ce paramètre ne convient pas dans le suivi de patients présentant des anomalies protéiques (cirrhose, syndrome néphrotique, dysglobulinémie). Les valeurs usuelles sont :

- pour un sujet non diabétique : 200 à 290 µmol/L ;
- pour un sujet diabétique équilibré : < 350 µmol/L.

Il existe une parfaite corrélation entre le taux d'Hb glyquées et celui des protéines glyquées. Les diabétologues pensent que le taux de protéines glyquées reflète l'aspect cumulatif des glycémies des deux ou trois dernières semaines, alors que le taux de HbA1c traduit celui des six à huit dernières semaines, du fait de leur demi-vie plus courte que celle de l'HbA1c.

# VII. Suivi biologique des complications

Comme nous l'avons dit précédemment, deux types de complications sont à redouter au cours de l'évolution de la maladie : la micro- et la macroangiopathie. Au cours du diabète de type 1, le risque de macroangiopathie est surtout lié à la survenue de la néphropathie diabétique. En ce qui concerne le diabète de type 2, la macroangiopathie est liée à l'hyperglycémie et aux marqueurs de risque cardiovasculaire, dont l'hypertension artérielle. Le suivi biologique des complications comprend actuellement deux volets : la microalbuminurie et le bilan lipidique.

## A. Évaluation de la microalbuminurie

Certaines études épidémiologiques montrent que plus de 30 % des diabétiques de type 1 finissent par présenter un tableau de néphropathie avec protéinurie, diminution de la filtration glomérulaire et HTA, conséquence de l'atteinte microangiopathique. Actuellement, l'évaluation de la microalbuminurie permet le dépistage de la néphropathie diabétique débutante à un stade où la créatininémie, sa clairance et la tension artérielle sont encore normales. Inversement, chez le sujet diabétique de type 2 (et dans la population normale), la microalbuminurie est un des témoins de risque de mortalité cardiovasculaire par insuffisance cardiaque ou atteinte coronarienne. 5 à 8 % des hypertendus présentent une microalbuminurie sans atteinte rénale débutante.

*Physiologie et définition* : normalement, une faible partie de l'albumine est filtrée par le glomérule rénal, puis réabsorbée à plus de 95 % par un phénomène actif mais rapidement saturable au niveau du tubule proximal. La quantité d'albumine retrouvée chez un sujet normal est très faible (< 14 mg/24 h). La microalbuminurie est définie comme une augmentation du taux d'excrétion urinaire de l'albumine, non décelable par utilisation de bandelettes et nécessitant l'emploi de techniques plus sensibles. Chez un diabétique, la microalbuminurie est d'origine glomérulaire et fait intervenir soit un facteur hémodynamique (différences de pression), soit un facteur membranaire (taille et/ou charge des pores), soit les deux.

*Prélèvement* : il existe différentes techniques de recueil des urines pour quantifier l'excrétion urinaire d'albumine :

- urines du matin ou urines de 24 heures dans un cadre de dépistage ;
- technique standardisée de recueil pour un suivi.

Certains facteurs sont susceptibles de la faire varier, comme l'exercice physique ou la charge hydrique.

*Techniques de dosage* : apparues dans les années 1980, elles font appel à une réaction antigène-anticorps par radio-immunologie (méthode de référence coûteuse), immunodiffusion radiale (méthode facile mais peu sensible), immunonéphélémétrie laser et immunoturbidimétrie (méthodes les plus utilisées, sensibles, rapides, reproductibles et bien corrélées à la méthode de référence mais dépendant du phénomène de zone – diluer convenablement les urines), immunoenzymologie (méthode sensible et économique mais longue).

Dernièrement, des bandelettes réactives (réaction colorimétrique ou immunoenzymatique) ont été commercialisées pour le dépistage de la microalbuminurie.

*Résultat* : pour ne pas écarter une néphropathie débutante, il est couramment admis de prendre pour valeur seuil un taux de 20 µg/min (30 mg/24 h ou 20 mg/L). La néphropathie présente un caractère permanent si le taux détecté est compris entre 30 et 300 mg/24 h, soit 20 à 200 µg/min, à au moins deux prélèvements sur trois, du fait de l'extrême variabilité de l'excrétion urinaire quotidienne de l'albumine. Chez les sujets diabétiques, sa détermination en vue d'un dépistage est recommandée tous les ans. Elle doit cependant être effectuée à distance d'un épisode infectieux ou d'un déséquilibre temporaire du diabète. Des paramètres associés (tension artérielle, clairance de la créatinine, échographie rénale, rétinopathie, etc.) permettent de classer la néphropathie diabétique en cinq stades et d'adapter le traitement hygiénodiététique et médicamenteux.

## B. Bilan lipidique

L'athérosclérose est devenue la première cause de décès des diabétiques. La corrélation entre le degré d'hyperglycémie et la sévérité des macroangiopathies est différente de celle des microangiopathies. Le diabète de type 2 n'est pas seulement une maladie du métabolisme glucidique mais une maladie des relations entre les métabolismes glucidique et lipidique. L'insulinorésistance du diabète de type 2 explique l'hyperinsulinisme entraînant une modification de la répartition des graisses. L'obésité entraîne une libération d'acides gras libres stimulant la néoglucogenèse hépatique et la synthèse des VLDL. Les dyslipidémies (qualitatives et/ou quantitatives) sont rencontrées fréquemment dans le diabète de type 2. Il est donc souhaitable d'effectuer un dépistage annuel de l'athérome par l'évaluation de :
- cholestérol et triglycérides ;
- HDL cholestérol (calcul du LDL cholestérol) ;
- apo B.

Les objectifs chez ces sujets sont maintenant :
- triglycérides < 1,50 g/L ;
- LDL cholestérol < 1 g/L ;
- HDL cholestérol > 0,40 g/L.

# VIII. Complications métaboliques des diabètes : comas hypo et hyperglycémiques, explorations biochimiques

Les comas correspondent à une souffrance du système nerveux central avec abolition des fonctions de relation et conservation plus ou moins complète de la vie végétative. Chez le diabétique, il existe quatre types de coma métabolique qui sont, par ordre de fréquence, les comas :
- hypoglycémique ;
- hyperglycémiques : acidocétosique, hyperosmolaire, par acidose lactique.

Ces comas sont des accidents graves, causes potentielles de mortalité, qui résultent de mécanismes physiopathologiques différents. Il est essentiel et possible d'éviter leur survenue. Cependant, en cas contraire, il est impératif de les reconnaître en urgence afin d'adapter la thérapeutique et de préciser le pronostic. L'étude biochimique est essentielle car elle fournit des résultats indispensables et en général très précis.

Les *différents examens biologiques* indispensables demandés par le praticien sont :
- examen d'*urines* : recherche de glucose, acétone, albumine ;
- *bilan sanguin complet* comprenant notamment la détermination de :
  - glycémie, urée (créatinine), protides et hématocrite,
  - électrolytes,
  - gaz du sang, pH, acide lactique.

L'ensemble des modifications biochimiques observées au cours de ces complications métaboliques est regroupé dans le *tableau 2*.

**Tableau 2.** Caractéristiques des différents types de coma chez le diabétique

| | | Signes biologiques | | | | | | | | | | | | Remarques |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Glycémie | Glycosurie | Corps cétoniques | Bicarbonates | pH sanguin | Ionogramme sanguin | | | Acide lactique | Hématocrite | Protides sériques | Urémie | |
| | | | | | | | Na⁺ | K⁺ | Cl⁻ | | | | | |
| COMA | HYPOGLYCÉMIQUE | ↓↓ | 0 | 0 | N | N | N | N | N | N | N | N | N | |
| | ACIDOCÉTOSIQUE | ↑↑ | ↑↑ | +++ | ↓↓ | N ou ↓* | ↑ | ↑ puis ↓ | ↑ | N | ↑↑ | ↑↑ | ↑ | Deshydratation globale et modification du pH par cétose |
| | HYPEROSMOLAIRE | ↑↑↑ | ↑↑↑ | 0 | N | N | ↑ | N | ↑ | N | ↑↑ | ↑↑ | ↑ | Deshydratation globale |
| | PAR ACIDOSE LACTIQUE | ↑ | 0 ou ↑ | 0 | ↓ | N ou ↓* | N ou ↓ | N ou ↑ | ↓ | ↑↑ | N | N | ↑ | Modification du pH par lactates |

* si décompensation.

## A. Coma hypoglycémique

Encore trop fréquent et probablement le plus grave de conséquences s'il n'est pas traité.

### 1. Physiopathologie

Deux mécanismes favorisent l'apparition du coma : l'*hypoglycémie* entraîne une augmentation du débit vasculaire cérébral pour apporter une quantité suffisante d'oxygène au niveau du cerveau. Cette compensation devient insuffisante et la consommation d'oxygène diminue. La réaction adrénergique de compensation fait apparaître les premiers signes généraux : sueurs, pâleur, angoisse.
Le *glucose* est la *seule énergie que le cerveau* peut utiliser puisque sa réserve en glycogène est faible. Après consommation de ces réserves, un coma s'installe progressivement.

### 2. Circonstances d'apparition

Ce type de coma est toujours la traduction d'un déséquilibre entre l'apport alimentaire et la thérapeutique hypoglycémiante. Il apparaît :

- le plus souvent chez le sujet diabétique de type 1 ; le risque augmentant parallèlement à un meilleur équilibre du diabète avec inadéquation entre dose d'insuline, apports glucidiques et activité physique, alcool, etc. ;
- également chez le diabétique de type 2 traité par les sulfamides hypoglycémiants à durée d'action longue (rechercher l'association avec des médicaments potentialisant l'effet : salicylés, AVK, autres sulfamides, etc.).

L'incidence estimée est de 2/10 000 et l'accident grave, le coma, arrive le plus souvent après des épisodes de petites hypoglycémies négligées. Les signes d'alerte à reconnaître sont des troubles visuels, des troubles de l'humeur et du langage nécessitant l'autosucrage et l'éducation de l'entourage.

### 3. Signes biochimiques

L'étude biochimique nécessite *a minima* la détermination de la glycémie et la recherche de glycosurie et d'acétonurie. Les résultats sont les suivants :

- *hypoglycémie* :
  - mineure : 2,2 à 3,9 mmol/L (0,20 à 0,40 g/L) se traduisant sur le plan clinique par des signes fonctionnels d'hypoglycémie telles que sueurs, palpitations, pâleur, anxiété, faim, crampes,
  - majeure : < 2,2 mmol/L (< 0,20 g/L) avec troubles de la conscience, convulsions puis coma avec signe de Babinski bilatéral (extension de l'orteil sous excitation de la plante du pied) par atteinte du faisceau pyramidal ;
- *recherches urinaires* : glycosurie absence ;
  acétonurie absence ;
- *bilan acidobasique* (pH, bicarbonates) : normal.

### 4. Traitement, épreuve thérapeutique

Après identification de ce type de coma, le traitement correspond à l'épreuve thérapeutique par injection de glucagon en intramusculaire (1 mg) ou de sérum glucosé à 30 % en intraveineuse. Le traitement doit entraîner un retour immédiat à la conscience. Mis en œuvre rapidement, il évitera les séquelles neurologiques. L'hypoglycémie doit donc être diagnostiquée en urgence et traitée rapidement. Il ne faut en outre pas oublier que certaines intoxications (alcools, paracétamol) sont hypoglycémiantes.

## B. Comas hyperglycémiques

Il s'agit des comas acidocétosique, hyperosmolaire et par acidose lactique. Ils sont d'étiologies très différentes, mais présentent tous un *signe commun* : la *déshydratation extra-* et *intracellulaire* qui se traduit par les signes suivants :
- *biochimiques*, par une augmentation de l'hématocrite, des protides sanguins et de l'urémie ;
- *cliniques* :
  - pour la déshydratation extracellulaire par une peau sèche, fripée avec un pli cutané, une tension artérielle diminuée et un pouls accéléré,
  - pour la déshydratation intracellulaire par une sécheresse de la bouche, soif et polydipsie.

### 1. Coma acidocétosique

C'est la complication fréquente du diabète de type 1 par carence en insuline : manifestation révélatrice du diabète (20 % des cas de diagnostic) ou d'un déséquilibre grave lors d'infections, stress, corticothérapie, usage de pompe ou démarche volontaire. La mortalité est encore importante. L'incidence est de 4 ‰ diabétiques.

#### a) Physiopathologie

Rappelons que l'insuline favorise la pénétration cellulaire du glucose et son utilisation par action sur les enzymes du métabolisme glucidique. Chez un sujet diabétique insulinodépendant, la carence en insuline mène donc à une diminution de la concentration intracellulaire en glucose, élément énergétique majeur des cellules. Ce défaut énergétique entraîne une mobilisation des acides gras. Ceux-ci sont catabolisés en acétyl-CoA, qui ne peut plus être utilisé par le cycle de Krebs et est transformé en corps cétoniques – acides acétoacétique et β-hydroxybutyrique. Ces derniers apparaissent au niveau sanguin puis urinaire, d'autant que l'utilisation périphérique des corps cétoniques est diminuée lors des carences en insuline (voir « *Cétogenèse* »). L'hyperglycémie est la conséquence de carence en insuline, glycogénolyse et, surtout, néoglucogenèse.

#### b) Signes cliniques

*Au début* : accentuation des signes de diabète avec polyurie, polydipsie, polyphagie, asthénie.
*En l'absence de traitement* : coma progressif avec polypnée de Kussmaul, odeur acétonique de l'haleine, troubles digestifs (vomissements, principalement).

### c) Signes biochimiques

Trois déterminations doivent être effectuées en extrême urgence :
- *glycémie* : très augmentée > 13,5 mmol/L > 2,5 g/L

Cette mesure peut être effectuée au lit du malade avec les systèmes d'autosurveillance et vérifiée au laboratoire ;
- *glycosurie* : +++ avec polyurie ;
- recherche de *corps cétoniques* urinaires (voire sanguins) : présence importante.

D'autres perturbations métaboliques apparaissent, conséquences de l'hyperglycémie et de l'acidocétose. Elles sont appréciées par l'étude :
- d'un *ionogramme* complet ;
- de la détermination du taux de *protides* et de l'*hématocrite* ;
- du *pH* et des *gaz du sang*.

Ces différents paramètres seront modifiés si l'hyperglycémie et l'acidose se poursuivent ou si le traitement est mal adapté. L'hyperglycémie provoque une hyperosmolarité extracellulaire impliquant un appel d'eau du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire : il y a alors hémodilution fugace car polyurie osmotique au glucose associé.

L'acidocétose par augmentation des corps cétoniques se traduit par une *acidose métabolique* :
- d'abord compensée avec diminution des bicarbonates, de la $pCO_2$, sans modification du pH ;
- puis décompensée avec diminution associée des bicarbonates et du pH ;
- les corps cétoniques sont éliminés par voie urinaire, d'abord sous forme de sels d'ammonium (avec masquage d'ion $H^+$) puis sous forme de sels de potassium et de sodium.

Une déplétion potassique cellulaire s'installe avec hyperkaliémie par passage du potassium vers le milieu extracellulaire en raison de :
- l'hyperglycémie (non-pénétration cellulaire du glucose) ;
- l'acidose extracellulaire (présence de corps cétoniques) ;
- l'hypercatabolisme azoté par glyconéogenèse et carence en insuline.

L'hyperkaliémie est associée à une acidose cellulaire. Le potassium est ensuite éliminé à l'extérieur de l'organisme par la polyurie, par la cétonurie et aussi par des vomissements et parfois des diarrhées, ce qui entraîne une hypokaliémie.

Le *stade ultime* de cette complication spontanée du diabète est une *acidose grave* avec *déshydratation globale* qui se traduit d'un point de vue biologique par :
- une hémoconcentration (augmentation de l'hématocrite et des protides totaux) ;
- une augmentation de la natrémie et de l'urémie.

La déshydratation entraîne une hypovolémie responsable d'une insuffisance rénale fonctionnelle. Le traitement est fondé sur une insulinothérapie associée à du sérum physiologique (apport d'eau et de sodium), de potassium et de glucose isotonique.

## 2. Coma hyperosmolaire

Ce type de coma est très rare (5 à 10 %) mais toujours grave (mortalité : 20 à 30 %). Il se rencontre plus souvent chez des sujets âgés présentant un diabète de type 2, mais peut également être une manifestation inaugurale du diabète chez un sujet présentant un taux d'insuline plutôt faible et une hydratation insuffisante.

### a) Physiopathologie

Trois facteurs jouent principalement :
- l'*hyperglycémie*, conséquence d'un mauvais transfert cellulaire du glucose par insulinorésistance – le glucose s'accumule dans le secteur extracellulaire, provoquant un appel d'eau hors des cellules – et d'une augmentation de la néoglycogenèse et de la glycogénolyse ;
- la *glycosurie* et la *diurèse osmotique* : l'hyperglycémie entraîne une glycosurie avec une diurèse osmotique, voire hypo-osmotique. Cette polyurie n'est pas limitée par l'hormone antidiurétique et peut être aggravée par sudation, fièvre, vomissements et diarrhées. Une insuffisance rénale fonctionnelle associée rend impossible la compensation de cette polyurie ;
- l'*absence de cétose* : du fait d'un taux d'insuline résiduel, même faible, le glucose franchit la barrière cellulaire en quantité suffisante pour éviter la cétose.

### b) Circonstances déclenchantes diverses

- Infections aiguës (urinaires, respiratoires) et fièvre.
- Troubles digestifs (diarrhées).
- Accident neurologique (type accident vasculaire cérébral).
- Traitement mal conduit par les salidiurétiques, corticoïdes, bêtabloquants.
- Conditions météorologiques (chaleur importante).
- Mauvaise accessibilité aux boissons.

### c) Signes biologiques

De début progressif et souvent insidieux, apparaissent :
- des troubles métaboliques :
  - hyperglycémie très importante et glycosurie massive,
  - cétonurie : absente,
  - urémie augmentée par hypercatabolisme et insuffisance rénale ;
- des troubles hydroélectrolytiques :
  - pH et bicarbonates : normaux,
  - natrémie et chlorémie ; témoins de la déshydratation intracellulaire,
  - hématocrite et protides sériques : augmentés ; témoins de la déshydratation extracellulaire,

    augmentées, d'où déshydratation globale à prédominance intracellulaire
  - kaliémie : normale ou augmentée,
  - hyperosmolarité plasmatique majeure et toujours supérieure à 350 mosm/L (à calculer : approximativement [(Na + K) × 2] + glucose + urée).

Le traitement visera à corriger la volémie et l'équilibre hydroélectrolytique. Il sera associé à une insulinothérapie et une perfusion de glucose. Le pronostic est réservé généralement par risque de collapsus cardiovasculaire et de complications.

## 3. Coma par acidose lactique

Ce coma apparaît chez des sujets âgés généralement traités par des antidiabétiques oraux de type *biguanides*. Très rare, il est toujours d'un très mauvais pronostic.

### a) Physiopathologie

Elle est la conséquence du traitement chez un sujet âgé présentant, de façon associée, une hypoxie cellulaire entraînant une accumulation de lactates par excès de production, une insuffisance hépatique (augmentation du NAD réduit) et une inhibition de la néoglucogenèse par le traitement, les biguanides bloquant la néoglucogenèse et augmentant le pool d'acide lactique.
L'acide lactique est en effet le terme ultime de la glycolyse anaérobie musculaire. Il provient de la réduction de l'acide pyruvique par la lacticodéshydrogénase en présence de NAD réduit. Normalement, l'acide lactique formé (surtout dans le muscle) passe au niveau sanguin, puis est reconverti en acide pyruvique au niveau hépatique par gluconéogenèse. Dans le cas des hypoxies tissulaires, par augmentation de la production de NAD réduit, la quantité d'acide lactique formée est supérieure à celle pouvant être reconvertie avec insuffisance d'élimination rénale chez des sujets en insuffisance rénale.

### b) Signes cliniques

De début brutal et d'aggravation rapide, ils associent :
- un coma de type variable ;
- des troubles digestifs ;
- des signes respiratoires avec dyspnée d'acidose sans odeur acétonique de l'haleine ;
- une déshydratation aiguë globale, très importante ;
- un collapsus cardiovasculaire et une hypothermie.

### c) Signes biologiques

- Troubles métaboliques :
  - *glycémie* : augmentée, mais pas de façon très importante,
  - *glycosurie* : nulle ou très peu positive,
  - *cétonémie* et *cétonurie* : nulles,
  - lactacidémie ≥ 5 mmol/L ;
- Troubles hydroélectrolytiques :
  - *pH* et *bicarbonates* : fortement abaissés après décompensation,
  - *natrémie* : normale ou peu diminuée,
  - *kaliémie* : normale ou augmentée,
  - *chlorémie* : diminuée.

On met en évidence un trou anionique. La concentration en $[Na^+ + K^+ - (Cl^- + HCO_3^-)]$ s'élève, conséquence d'une élévation importante de l'acide lactique sanguin, qu'il est possible de doser ;
  - protides et hématocrite : normaux,
  - urémie : augmentée par hypotension, collapsus et oligoanurie.

Le traitement comprend des mesures de réanimation (volémie, diurèse, alcalinisation, épuration extrarénale) avec insulinothérapie et perfusion de glucose.

## Conclusion

Si le diagnostic de diabète est porté actuellement sur le seul critère de la glycémie, un certain nombre de tests biochimiques sont à la disposition du praticien pour surveiller dans le temps cette maladie évolutive, aussi bien dans son intensité (HbA1c) que dans la nature de ses complications (microalbuminurie, bilan lipidique). L'utilisation des lecteurs de glycémie permet à chaque patient une autosurveillance et une adaptation de son traitement. Les complications métaboliques du diabète sont encore trop fréquentes : il importe de les identifier mais surtout de les prévenir par une surveillance clinicobiologique adaptée.

***Pour en savoir plus***


- www.alfediam.org
- http://agmed.sante.gouv.fr
- *Bulletin épidémiologique hebdomadaire (BEH)* : 2006, 10 : 69-73.
- Mieux appréhender le diabète pour bien le dépister, dossier Formation. *Option Bio* ; 2006, 359 : 9-14.
- Perlemuter L. *et al. Diabète et maladies métaboliques*, Paris, Masson, 2003.
- Delattre J. *et al. Biochimie pathologique*, Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 2003.
- Marshall W.J. *et al. Biochimie médicale*, Paris, Elsevier- Camus référence, 2005.

# Les hyperlipoprotéinémies

G. LUC, Département d'athérosclérose, Inserm U325, Institut Pasteur, Lille.
J.-M. BARD, Laboratoire de biochimie, UFR de pharmacie, Nantes.

*Les hyperlipoprotéinémies ou hyperlipidémies sont un des principaux facteurs de risque des maladies cardiovasculaires. Leur dépistage et leur traitement entrent à ce titre dans le domaine de la prévention.*

# I. Dépistage

Le dépistage d'une hyperlipidémie doit être réalisé chez tout sujet adulte, et plus particulièrement :
- chez un sujet à risque cardiovasculaire élevé ;
- de façon systématique chez un sujet sans risque apparent et cela dès l'âge de 20 ou 25 ans.

Dans tous les cas, une exploration d'une anomalie lipidique (EAL) sera d'emblée réalisée, comprenant les mesures du cholestérol et des triglycérides, ainsi que du cholestérol HDL ou HDL-cholestérol (*high-density lipoprotein cholesterol*, HDL-C). Toutes les mesures des lipides sont réalisées sur un prélèvement pratiqué après douze heures de jeûne chez un sujet ne présentant pas de pathologie aiguë depuis deux mois (une pathologie aiguë modifie profondément et durablement les valeurs lipidiques).

# II. Classification

La classification des hyperlipoprotéinémies (ou hyperlipidémies) se fait selon les mesures du cholestérol LDL ou LDL-cholestérol (*low-density lipoprotein cholesterol*, LDL-C) et des triglycérides. Il n'existe pas de valeurs normales du cholestérol et des triglycérides. En effet, les valeurs normales sont définies par rapport à la distribution des valeurs dans une population de référence qui par définition doit être saine. Ce ne peut être le cas pour les lipides plasmatiques car dans le domaine de la prévention, un grand nombre de sujets peut présenter un risque élevé de maladie cardiovasculaire sans être malade. Les valeurs de référence pour le diagnostic d'une hyperlipidémie et les objectifs thérapeutiques sont ainsi fonction du risque cardiovasculaire observé lors des études épidémiologiques et des essais cliniques.
Un sujet est dit « normolipidémique » quand, en l'absence de tout facteur de risque, le LDL-C est inférieur à 1,60 g/L, les triglycérides à 1,50 g/L et le HDL-C supérieur à 0,40 g/L. Dans les autres cas, il s'agit d'une hyperlipidémie dont le risque de complications (athérosclérose ou pancréatite aiguë) est à évaluer.
*NB* : la limite des triglycérides est discutée. La concentration normale maximale paraît être à 1,50 g/L (sur le plan du risque cardiovasculaire).
Le premier geste diagnostique en présence d'une hyperlipidémie est la recherche d'une hyperlipidémie secondaire : cette dernière ayant été éliminée, le diagnostic est celui d'une hyperlipidémie primaire.
Le LDL-C est calculé par la formule de Friedewald

[LDL-C (g/L) = cholestérol – triglycérides/5 – HDL-C]

et ne peut être calculé que si les triglycérides sont inférieurs à 3,40 g/L. Trois types d'hyperlipidémies principales peuvent être définis :

- hypercholestérolémies correspondant à une augmentation du LDL-C, les triglycérides étant normaux (< 1,50 à 2 g/L) ;
- hypertriglycéridémies : triglycérides supérieurs à 2 g/L avec LDL-C < 1,60 g/L ou cholestérol total < 2 g/L ;
- hyperlipidémies mixtes correspondant à l'augmentation du LDL-C et des triglycérides.

Pour transformer l'unité g/L en mmol/L, multiplier la valeur en g/L par 2,58 pour le cholestérol et 1,14 pour les triglycérides.

# III. Hypercholestérolémie

L'hypercholestérolémie correspond à une élévation de la concentration plasmatique des LDL. Elle a pour conséquence un risque d'athérosclérose qui augmente exponentiellement avec la concentration du LDL-C.

## A. Diagnostic

Chez un sujet appartenant à une population à risque cardiovasculaire, une exploration d'une anomalie lipidique doit systématiquement être réalisée après un jeûne de douze heures. La découverte d'un LDL-C élevé par rapport au risque cardiovasculaire qu'il présente (simultanément à des triglycérides normaux), confirmé par un deuxième examen une ou deux semaines plus tard, permet d'établir le diagnostic d'hypercholestérolémie nécessitant une prise en charge thérapeutique.

## B. Conduite à tenir

Après avoir éliminé une hypothyroïdie, seule affection découverte lors du diagnostic d'hypercholestérolémie (voir *ci-dessous*), le diagnostic consiste à évaluer le risque cardiovasculaire et, s'il est élevé, à entreprendre un traitement hypocholestérolémiant.
Quel que soit le risque, un traitement visant à atteindre un équilibre alimentaire si nécessaire est indispensable dès lors que le LDL-C est supérieur à 1,60 g/L. Après quelques semaines d'équilibre alimentaire, un nouveau bilan biologique est réalisé (EAL) et permettra au médecin d'envisager la prescription d'un hypocholestérolémiant. Les recommandations publiées par l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps) en mars 2005 indiquent clairement la conduite à tenir vis-à-vis d'une hypercholestérolémie. La prescription dépend du risque cardiovasculaire évalué. Plus le risque est élevé, plus la prescription s'avère nécessaire. Ainsi, on distingue deux catégories de sujets.
La *première catégorie* correspond à des sujets en prévention primaire (absence de pathologie vasculaire athéroscléreuse symptomatique). Dans ce cas, le nombre de facteurs de risque est calculé. Les facteurs de risque pris en compte sont :

- homme ≥ 50 ans, femme ≥ 60 ans ;
- antécédents familiaux d'athérosclérose précoce ;

- tabagisme actuel ou arrêté depuis < 3 ans ;
- hypertension artérielle ou traitement antihypertenseur ;
- diabète de type 2 ;
- HDL-cholestérol < 0,40 g/L.

Ainsi, un sujet peut présenter de zéro à six facteurs de risque. Si le HDL-cholestérol est supérieur à 0,60 g/L, le nombre de facteurs de risque est diminué d'un. En fonction du nombre de facteurs de risque, un traitement sera institué si le LDL-cholestérol dépasse la valeur seuil indiquée dans le *tableau*.

**Tableau 1.** Traitement à instaurer selon le taux de LDL-C

| Nombre de facteurs de risque, prévention primaire | Seuils de prescription d'un hypocholestérolémiant LDL-cholestérol (g/L) |
|---|---|
| 0 | > 2,20 |
| 1 | > 1,90 |
| 2 | > 1,60 |
| > 2 | > 1,30 |

L'objectif thérapeutique est d'obtenir un LDL-C au-dessous de la valeur seuil indiquée dans le *tableau*.

La *deuxième catégorie* de sujets concerne ceux qui présentent un risque cardiovasculaire élevé. Cette catégorie se subdivise en trois groupes :

- sujets avec des antécédents de maladie coronaire ou de maladie vasculaire périphérique (accident vasculaire cérébral, artériopathie des membres inférieurs de stade II) ;
- sujets présentant un diabète de type 2 (diabète non insulinodépendant) et une atteinte rénale (protéinurie > 300 mg/24 h ou clairance de la créatinine > 60 ml/min) ou deux autres facteurs de risque parmi la liste indiquée ci-dessus, à laquelle il faut ajouter une microalbuminurie > 30 mg/24 h ;
- sujets ayant un risque coronarien (non inclus dans les groupes décrits ci-dessus) supérieur à 20 % sur dix ans. Ce risque est évalué selon des échelles dont la plus utile est celle de Framingham, qui peut être consultée sur le site de l'Afssaps. Cette échelle calcule un score, chaque facteur de risque étant doté d'un certain nombre de points en fonction non seulement de sa présence, mais également de son intensité. Ce score permet d'obtenir la probabilité de voir apparaître un accident ischémique à risque cardiovasculaire dans les dix ans à venir. Les sujets inclus dans ce groupe peuvent être en prévention primaire : en pratique, seuls les sujets avec au moins deux facteurs de risque peuvent courir un risque cardiovasculaire supérieur à 20 %.

Le seuil de prescription d'un hypocholestérolémiant est un LDL-C supérieur à 1 g/L. Un seuil de 0,70 g/L peut même être utilisé chez les sujets à très haut risque (par exemple, les sujets souffrant d'une maladie coronaire et présentant d'autres facteurs de risque persistant).

La plupart des hypercholestérolémies sont modérées et leur physiopathologie correspond à une intrication de facteurs d'environnement (essentiellement un déséquilibre alimentaire) et de facteurs génétiques. À l'inverse, les hypercholestérolémies importantes correspondent le plus souvent à une hypercholestérolémie familiale.

## C. Hypercholestérolémie familiale

L'hypercholestérolémie familiale est une maladie monogénique autosomique dominante fréquente (1 ou 2/1 000 naissances). La forme hétérozygote présente typiquement :

- des xanthomes tendineux ;
- un xanthélasma et des arcs cornéens ;
- une maladie coronarienne précoce débutant fréquemment par une angine de poitrine après l'âge de 30 ans (le traitement hypolipidémiant retarde l'apparition de l'insuffisance coronaire) ;
- un des deux parents est hypercholestérolémique et/ou décédé d'athérosclérose précoce avant 50 ans (ce parent était alors vraisemblablement hypercholestérolémique), l'autre étant normolipidémique ;
- un cholestérol supérieur à 2,80 g/L, les triglycérides étant habituellement normaux, inférieurs à 2 g/L. L'élévation du cholestérol est la conséquence d'une augmentation du LDL-C qui est supérieur à 2,00 g/L.

Les critères diagnostiques sont ainsi :

- une hypercholestérolémie importante : la plupart des sujets présentent une hypercholestérolémie importante avec un LDL-C supérieur à 2,20 g/L ;
- la présence de dépôts lipidiques extravasculaires ;
- une transmission monogénique dominante, déterminée par la présence d'une hypercholestérolémie ou une insuffisance coronaire précoce chez un des deux parents.

Deux de ces critères suffisent au diagnostic. Le diagnostic est affirmé par la découverte de l'anomalie génétique (mutation du LDL-récepteur ou de l'apolipoprotéine B). Plus rarement, d'autres anomalies génétiques sont présentes. Cette recherche n'est cependant pas accessible en routine.

### 1. Physiopathologie

Deux mécanismes ont été découverts pour expliquer l'hypercholestérolémie familiale : le déficit en récepteurs aux LDL et la mutation 3500 de l'apo B100.

### 2. Déficit en récepteurs des LDL

La cause primitive de l'élévation importante des LDL retrouvée dans cette affection est une diminution du nombre des récepteurs des LDL. Ce déficit apparaît aussi bien sur les fibroblastes en culture provenant de tels malades que sur les membranes hépatiques obtenues après biopsie chirurgicale. Deux formes existent selon l'état hétérozygote ou homozygote de l'affection. L'état homozygote se caractérise par l'atteinte fonctionnelle des LDL récepteurs (chromosome 19) provenant des deux parents. La liaison spécifique des LDL sur les cellules de ces malades est alors inférieure à 30 % de la normale (< 5 % : *receptor-negative*. Entre 5 et 30 % : *receptor-defective*). Parfois, la liaison au récepteur est normale mais le complexe LDL-récepteur n'est pas internalisé dans la cellule (défaut d'internalisation). Le type d'anomalie du récepteur peut être variable : le récepteur normal est en effet synthétisé dans le réticulum endoplasmique sous forme d'un précurseur de poids moléculaire 120 000. Ce précurseur est ensuite modifié dans l'appareil de Golgi (addition d'hydrates de carbone), pour atteindre sa forme définitive de poids moléculaire 160 000. Celui-ci gagne alors la membrane plasmique. L'étude

des récepteurs, grâce à des tests fonctionnels sur cellules, montre que plusieurs mutations différentes entraînant les mêmes perturbations phénotypiques peuvent être dépistées chez des sujets homozygotes. Actuellement, trois classes sont connues :

- classe I : aucune synthèse de précurseur ;
- classe II : précurseur détecté mais non transformé en récepteur définitif. Trois sous-classes selon le poids moléculaire du précurseur ;
- classe III : précurseur détecté se transformant normalement en récepteur, celui n'apparaissant pas, ou à une vitesse faible, à la surface de la cellule. Trois sous-classes selon le poids moléculaire du précurseur (100 000, 120 000 et 170 000).

La diminution du nombre de récepteurs entraîne une augmentation du temps de séjour des LDL dans le plasma (demi-vie des LDL : cinq jours chez les homozygotes, trois jours chez les sujets normaux). Cet accroissement entraîne une élévation du taux de LDL. Mais il existe également une augmentation (faible ou nulle chez les sujets hétérozygotes, ou importante chez les homozygotes) de la synthèse des LDL. Cette synthèse pourrait provenir indirectement du foie, ou serait consécutive à un catabolisme accru des VLDL (*very low density lipoproteins*, lipoprotéines de très basse densité).

### 3. Mutation de l'apo B100

Un changement du 3 500$^{e}$ acide aminé de l'apo B100 entraîne une diminution de la reconnaissance de l'apo B100 par le récepteur des LDL. Cette absence de reconnaissance a pour conséquence la persistance des LDL dans le plasma par défaut du catabolisme et, corollairement, une hypercholestérolémie pouvant cliniquement être similaire à l'hypercholestérolémie par déficit en récepteur des LDL.

## IV. Hyperlipidémie avec élévation des triglycérides

L'élévation des triglycérides correspond à des triglycérides plasmatiques supérieurs à 2 g/L. La plupart des hyperlipidémies présentant une élévation des triglycérides correspondent à une hyperlipidémie mixte, parfois à une hypertriglycéridémie pure. Les triglycérides peuvent dépasser 2 g/L lors d'une hypercholestérolémie très importante, mais dans ce cas, le rapport cholestérol-triglycérides reste supérieur à 2,5.
L'augmentation des triglycérides correspond à l'élévation des VLDL. Les risques induits par cette hyperlipidémie sont d'une part la survenue d'une pancréatite aiguë si les triglycérides sont supérieurs à 10 g/L, d'autre part un risque d'athérosclérose surtout si l'augmentation des triglycérides s'accompagne d'une augmentation du LDL-C et/ou d'une baisse du HDL-C.

### A. Diagnostic

Une élévation des triglycérides se définit par une concentration plasmatique de triglycérides, classiquement supérieure à 2 g/L (dosage réalisé après douze heures de jeûne). La présence simultanée d'une augmentation des triglycérides et d'un LDL-C élevé fait poser le diagnostic d'hyperlipidémie mixte, celle d'une élévation des triglycérides simultanément à un LDL-C normal, celui d'une hypertriglycéridémie pure.

La présence d'une hypertriglycéridémie doit systématiquement faire rechercher un facteur favorisant : résistance à l'insuline observée lors d'un syndrome métabolique et consommation excessive d'alcool ou parfois d'un médicament. Enfin, il existe des sujets présentant une hypertriglycéridémie quasi exclusivement d'origine génétique. Le syndrome métabolique est la pathologie la plus fréquemment à l'origine d'une hypertriglycéridémie.

## B. Syndrome métabolique

Le syndrome métabolique correspond à un ensemble de signes associant de façon presque constante un surpoids de type androïde, une résistance à l'insuline, des anomalies lipidiques et une hypertension artérielle.
Le syndrome métabolique se définit ainsi par la présence de trois des cinq facteurs suivants :

- tour de taille homme > 102 cm, femme > 88 cm ;
- triglycérides > 1,50 g/L ou traitement hypotriglycéridémiant ;
- HDL-cholestérol homme < 0,40 g/L, femme < 0,50 g/L ;
- glycémie > 1 g/L ou traitement hypoglycémiant ;
- tension artérielle systolique > 130, diasystolique > 85mmHg ou traitement anti-hypertenseur.

Le risque du syndrome métabolique est l'apparition d'un diabète non insulinodépendant et celui d'un accident ischémique.

## C. Consommation excessive d'alcool

La consommation excessive d'alcool peut être à l'origine d'une hypertriglycéridémie ou accentuer une hyperglycéridémie déjà présente. La quantité d'alcool au-dessus de laquelle les triglycérides augmentent est variable d'un sujet à un autre, ce qui explique les grandes différences de sensibilité aux boissons alcoolisées vis-à-vis des anomalies lipidiques. Le seul moyen d'établir un diagnostic est le test d'abstinence, la sensibilité à l'alcool étant définie par une chute de la triglycéridémie lors de l'arrêt de toute boisson alcoolisée. Un dosage à jeun des triglycérides et du cholestérol avant et après cette période suffisent au diagnostic. Cette sensibilité à l'alcool est responsable d'un pourcentage minime d'hypertriglycéridémie (le syndrome métabolique est plus fréquent).
La prise en charge thérapeutique de l'augmentation des triglycérides – souvent grâce à la maîtrise du ou des facteurs favorisants – permettra de diminuer, voire de normaliser, les triglycérides. Il sera alors possible d'analyser le LDL-C qui nécessitera une éventuelle prise en charge particulière.
Trois types d'hyperlipidémie présentant une augmentation des triglycérides et d'origine génétique ont été caractérisés. L'une d'elles est fréquente (hyperlipidémie familiale combinée), les deux autres rares (hyperlipidémie de type III, hypertriglycéridémie par déficit en lipoprotéine lipase). Cependant, l'ensemble de ces trois types d'hyperlipidémie est loin de correspondre à l'ensemble des hyperlipidémies caractérisées par une élévation des triglycérides.

## D. Médicaments

Un certain nombre de médicaments peut se trouver à l'origine de l'apparition ou d'une aggravation d'une hypertriglycéridémie. Parmi ceux-ci, certains ne peuvent être stoppés – antiprotéases utilisées chez les patients présentant un sida, corticoïdes au long cours –, tandis que d'autres peuvent être arrêtés, comme les rétinoïdes utilisés dans les traitements contre l'acné. Certains antipsychotiques sont également responsables d'une hypertriglycéridémie, mais s'associent souvent à une augmentation du poids (similaire à celle observée dans le syndrome métabolique) qui peut aussi favoriser l'apparition d'une hypertriglycéridémie.

## E. Hyperlipidémie de type III

Cette hyperlipidémie appelée également « dysbêtalipoprotéinémie » ou *broad beta disease* se caractérise cliniquement par des dépôts des plis palmaires *Xanthoma striata palmaris*, des xanthomes tubéreux et une athéromatose accélérée atteignant les territoires coronariens et artériels des membres inférieurs. Les personnes atteintes de ce type d'hyperlipidémie présentent une élévation des concentrations de cholestérol et de triglycérides plasmatiques du fait de l'accumulation de lipoprotéines anormales appelées « β-VLDL ». Ces β-VLDL diffèrent des VLDL normales par leur enrichissement en cholestérol, leur composition en apolipoprotéines et leur mobilité β en électrophorèse.

### 1. Affirmation diagnostique

Elle nécessite d'autres explorations biologiques que celle des dosages de cholestérol et de triglycérides. La première est une *électrophorèse des lipoprotéines* qui renforce le diagnostic en montrant une bande continue entre les bandes bêta et pré-bêta-lipoprotéines. La poursuite de l'exploration biologique nécessite un laboratoire spécialisé. L'ultracentrifugation du plasma va séparer les VLDL. L'analyse de la composition lipidique des VLDL va montrer l'enrichissement anormal de ces lipoprotéines en cholestérol comme les rapports cholestérol-VLDL/triglycérides-VLDL (valeurs usuelles < 0,42) et cholestérol-VLDL/triglycérides plasmatiques (valeurs usuelles < 0,18) sont supérieurs aux valeurs usuelles. Enfin, la détermination du *phénotype de l'apo E* est l'élément capital du diagnostic car 95 % des sujets avec une hyperlipidémie de type III présentent un phénotype $E_{2/2}$ (contre 1 % dans la population normolipidémique). Ce phénotype se détermine par isofocalisation électrique soit à partir du plasma, soit à partir des VLDL, soit par biologie moléculaire. Cette recherche peut être réalisée d'emblée dès la suspicion clinique du diagnostic (omettant ainsi l'étape de l'analyse chimique des VLDL).

### 2. Physiopathologie

La physiopathologie de cette maladie rare (1/5 000) est centrée par l'apo E. L'apo E est une protéine constituée d'une chaîne unique de 299 acides aminés, codée par un gène présent sur le chromosome 19. Chaque sujet présente donc une apo E provenant de deux gènes, l'un d'origine paternelle, l'autre d'origine maternelle, l'apo E étant codée à partir de plusieurs allèles (appelés « ε ») sur un locus. Des mutations ponctuelles d'un ou de plusieurs acides aminés entraînent un polymorphisme de

l'apo E. La classification actuelle est fonction de la charge relative à l'apo E présente chez chaque sujet. Les apo E sont dénommées suivant ce critère : les plus fréquentes sont E2, E3, E4 (mais apo E1 et apo E5 ont été dépistées). Ainsi, les apo E2, E3, E4 sont détectées par la technique d'isofocalisation électrique (technique de séparation des protéines en fonction de leur charge électrique). Il existe donc six phénotypes différents, trois homozygotes $E_{2/2}$, $E_{3/3}$, $E_{4/4}$ et trois hétérozygotes $E_{4/2}$, $E_{3/2}$ et $E_{4/3}$. Les études épidémiologiques ont montré que les sujets atteints d'hyperlipidémie de type III présentaient le plus souvent un phénotype $E_{2/2}$ (95 % des cas).
L'apo E2 paraît donc entraîner une modification du métabolisme des lipoprotéines conduisant à une hyperlipidémie athérogène.
L'apo E3 complexée à des liposomes se lie de façon spécifique et avec une haute affinité (affinité quatre fois plus importante que celle des LDL), au LDL récepteur. Cependant, l'apo E2, correspondant à l'allèle E2, se lie faiblement au LDL récepteur (1 % de la liaison de l'apo E2).
Plusieurs conséquences de ces anomalies sur le métabolisme des lipoprotéines peuvent apparaître. La principale est le défaut de captation des restes de VLDL ou de chylomicrons par le foie. La captation des résidus de chylomicrons se fait grâce à la reconnaissance de l'apo E par un récepteur hépatique spécifique de l'apo E. L'apo E n'étant pas reconnue, les débris de chylomicrons de VLDL s'accumulent dans le plasma. Certains auteurs pensent ainsi que la liaison de ces particules au récepteur hépatique à l'apo E est nécessaire à la transformation en LDL dont le taux est généralement bas dans cette maladie.
Cependant, le phénotype $E_{2/2}$ est retrouvé chez 1 % des sujets normolipidémiques, la fréquence de l'hyperlipidémie de type III étant d'environ 0,02. Ainsi, la présence du phénotype $E_{2/2}$ est nécessaire mais pas suffisante pour l'apparition d'une hyperlipidémie de type III. Le sujet $E_{2/2}$ normolipidémique possède des possibilités cataboliques suffisantes pour métaboliser les débris de chylomicrons et de VLDL. Si celles-ci sont dépassées du fait d'une synthèse accrue de VLDL comme en présence d'un facteur hypertriglycéridémique (obésité, erreurs alimentaires, hyperlipidémie familiale combinée, grossesse) ou lors d'une diminution du catabolisme (hypothyroïdie ou ménopause), une hyperlipidémie de type III apparaît.

## F. Hyperlipidémie familiale combinée

### 1. Diagnostic

La reconnaissance de l'hyperlipidémie familiale combinée peut sembler ardue, car les critères diagnostiques sont difficiles à rassembler. Cependant, cette hyperlipidémie paraît une des hyperlipidémies athérogènes les plus fréquentes.
Le sujet propositus peut présenter soit une hypertriglycéridémie, soit une élévation du cholestérol LDL, soit l'association de ces deux anomalies, soit l'alternance d'un profil lipidique à un autre. Dans la majorité des cas, les élévations des triglycérides et du cholestérol sont relativement modestes (2,50 à 3,00 g/L).
L'enquête familiale est déterminante pour le diagnostic, puisque cette maladie apparaît chez la moitié des parents du premier degré. Si les bilans lipidiques des sujets de la famille sont disponibles, on constatera que parmi les sujets hyperlipidémiques, certains ont une élévation isolée des triglycérides, d'autres du cholestérol

LDL et d'autres encore des deux paramètres. Cependant, l'hyperlipidémie n'apparaît qu'après l'âge de 20 ou 25 ans, l'apparition de cette hyperlipidémie chez l'enfant étant peu fréquente (moins de 10 % des cas). Cette hyperlipidémie est athérogène avec une symptomatologie coronarienne précoce, souvent dès l'âge de 45 ans.
L'hyperapobêtalipoprotéinémie est rattachée à cette affection : il s'agit d'une dyslipidémie car si le cholestérol et les triglycérides sont relativement normaux, c'est l'apo B qui est élevée. Il s'agirait d'une forme clinique également athérogène de l'hyperlipidémie familiale combinée.
Bien que l'hyperlipidémie familiale combinée puisse être correctement définie selon les critères indiqués ci-dessus, il semble que les sujets présentant cette pathologie correspondent à un sous-groupe du syndrome métabolique. En effet, ces sujets présentent très souvent un surpoids et une résistance à l'insuline. Une susceptibilité génétique non encore déterminée ne ferait apparaître cette hyperlipidémie que lors de la prise de poids, d'où une pénétrance qui augmente avec l'âge.
L'examen clinique ne permet nullement d'envisager le diagnostic, le seul dépôt extravasculaire parfois visible étant un arc cornéen, signe non spécifique.
Sur le plan biologique, la mesure de la concentration de l'apo B peut être demandée, car elle est souvent plus élevée que ne le voudraient les triglycérides ou le cholestérol LDL mais cela reste cependant d'appréciation difficile.

### 2. Physiopathologie

La physiopathologie de l'hyperlipidémie familiale combinée n'est pas connue avec précision. En effet, ce syndrome semble recouvrir plusieurs anomalies différentes selon les sujets atteints. Le trait commun est une augmentation de la synthèse hépatique de l'apo B100. L'accentuation de la production de cette protéine s'accompagne d'un accroissement du nombre de particules VLDL produites par le foie. Ces VLDL gardent cependant une composition normale. En fonction des capacités cataboliques du sujet atteint, les VLDL peuvent être en concentration normale si celles-ci sont rapidement transformées en LDL (hypercholestérolémie), en concentration élevée si le catabolisme est lent, les LDL étant alors en concentration normale (forme hypertriglycéridémique). Si les capacités métaboliques du sujet sont intermédiaires aux deux formes précédentes, la concentration en LDL et celle des triglycérides seront élevées (forme d'hyperlipidémie mixte).
Certaines anomalies génétiques ont été suggérées : déficit partiel en lipoprotéine lipase, dysfonction d'une protéine plasmatique, l'ASP (*acylation-stimulating protein*).

## G. Hypertriglycéridémie par déficit d'activité en lipoprotéine lipase

### 1. Diagnostic

Cette hyperlipidémie peut se présenter comme un type I (présence de chylomicrons sans augmentation des VLDL) et type V (augmentation des VLDL et présence des chylomicrons). Un même mécanisme peut entraîner l'un des deux types électrophorétiques. L'étude de ces hyperlipidémies a surtout porté sur l'enzyme clé du catabolisme des particules riches en triglycérides, la lipoprotéine lipase. La lipoprotéine lipase (LPL) est située à la surface de l'endothélium capillaire de certains tissus

(tissu adipeux, muscles) dans les cellules desquelles elle est synthétisée avant de migrer et de s'attacher à la membrane plasmique des cellules endothéliales, par une chaîne de glycosaminoglycanes. L'enzyme hydrolyse les triglycérides des chylomicrons et des VLDL.

Cette hyperlipidémie se caractérise par sa sensibilité aux graisses alimentaires. Une alimentation riche en graisses alimentaires (60 à 70 % de calories) va entraîner immédiatement une augmentation des triglycérides (contrairement à ce que l'on peut constater chez le sujet normal). Cette hyperlipidémie est souvent découverte chez l'enfant au décours d'une pancréatite aiguë (mais celle-ci n'est nullement affirmative de leur diagnostic). Une xanthomatose éruptive peut apparaître et il existe fréquemment une hépatosplénomégalie.

### 2. Physiopathologie

La définition même de cette hyperlipidémie est un déficit d'activité de la lipoprotéine lipase dans le plasma après injection intraveineuse d'héparine. Cette activité peut être menée dans des laboratoires très spécialisés. Deux mécanismes sont connus :

- défaut du gène de la lipoprotéine lipase : il entraîne soit une absence de synthèse de l'enzyme, soit une enzyme synthétisée mais n'ayant aucune activité d'hydrolyse des triglycérides du fait d'une structure anormale. De nombreuses mutations ont été réparées ;
- anomalie de l'apo CII : l'apolipoprotéine est indispensable à l'activité de la lipoprotéine lipase. Une absence de synthèse ou une apo CII anormale entraîne l'absence d'activité de la lipoprotéine lipase, pourtant de structure normale. L'absence d'activité lipoprotéine lipase chez ces sujets entraîne un catabolisme très lent des lipoprotéines riches en triglycérides (VLDL et chylomicrons) et donc une hypertriglycéridémie importante.

## V. Hypoalphalipoprotéinémies

Une hypoalphalipoprotéinémie se définit par une concentration basse en HDL (représentée par le HDL-C). La limite fixée est souvent 0,40 g/L. La cause la plus fréquente de l'hypoalphalipoprotéinémie est la présence d'un syndrome métabolique. Cependant, certains rares sujets présentent une hypoalphalipoprotéinémie sévère avec un HDL-C inférieur à 0,25 g/L. Il existe souvent chez ces sujets une hypertriglycéridémie modérée, conséquence de la concentration basse des HDL (*NB* : dans le syndrome métabolique, la concentration basse des HDL est la conséquence de l'hypertriglycéridémie). Les hypoalphalipoprotéinémies sont d'origine génétique. Les causes actuellement connues sont des mutations des gènes soit de l'ABCA1 (responsables de la maladie de Tangier), soit de la LCAT (entraînant soit un déficit partiel responsable de la pathologie appelée « *fish-eye disease* »), soit de l'apo AI. Le risque pathologique lié à une hypoalphalipoprotéinémie sévère est attaché à sa cause. La recherche de la mutation responsable est donc importante et n'est réalisée que dans des centres extrêmement spécialisés.

# VI. Hyperlipoprotéinémies secondaires

Les hyperlipoprotéinémies secondaires sont la conséquence d'une affection primaire et régressent généralement après traitement de cette affection. Cependant, l'apparition d'une hyperlipidémie secondaire est souvent la résultante d'une affection hyperlipidémiante chez un sujet ayant une susceptibilité génétique. Ainsi, la disparition de la cause nécessitera l'évaluation ultérieure du bilan lipidique, car celle-ci persiste souvent, même si elle apparaît à un moindre degré.
La résistance à l'insuline et la consommation excessive d'alcool peuvent apparaître comme des causes d'hyperlipidémie (voir *ci-dessus*). Cependant, leur fréquence dans l'apparition d'une augmentation des triglycérides les a fait traiter lors de la conduite à tenir devant une élévation des triglycérides.

## A. Hyperlipoprotéinémies secondaires aux affections rénales

Les patients souffrant d'une insuffisance rénale chronique présentent généralement une hypertriglycéridémie avec augmentation de l'apolipoprotéine CIII et diminution des apolipoprotéines AI et AII. Les syndromes néphrotiques sont associés à une hypercholestérolémie essentielle dans les formes légères et à une hyperlipidémie mixte dans les formes plus sévères.

## B. Hyperlipoprotéinémies secondaires aux affections hépatiques

L'hépatite aiguë non cholestatique est souvent associée à une hypertriglycéridémie nette associée à une élévation légère du cholestérol et des phospholipides. Les apolipoprotéines AI et AII et l'apolipoprotéine CIII sont souvent diminuées, l'apolipoprotéine B peut être augmentée.
À l'inverse, les cirrhoses sont souvent associées à une diminution de la synthèse des lipoprotéines, notamment les LDL. Rappelons que la cholestase se caractérise par la présence d'une lipoprotéine anormale, la LpX (*lipid peroxid*).

## C. Hyperlipoprotéinémies secondaires au diabète

Le diabète, qu'il soit insulinodépendant ou non insulinodépendant, est souvent associé à une hypertriglycéridémie, à une augmentation des VLDL et une diminution des HDL. On observera généralement une hypertriglycéridémie, plus rarement une hyperlipidémie mixte. Les apolipoprotéines CIII et E peuvent être augmentées et l'apolipoprotéine AI diminuée. L'augmentation de l'apolipoprotéine B n'est pas toujours retrouvée.

## D. Hyperlipoprotéinémies secondaires aux affections thyroïdiennes

L'hypothyroïdie provoque presque toujours une hypercholestérolémie ou une hyperlipidémie mixte avec augmentation de l'apolipoprotéine B, alors que l'hyperthyroïdie est le plus souvent associée à une hypocholestérolémie. Les anomalies sont essentiellement en relation avec une modification du nombre de récepteurs aux LDL, celui diminuant en même temps que la fonction thyroïdienne et vice-versa.

# VII. Analyse des lipides plasmatiques

## A. Détermination du cholestérol

Le cholestérol peut être mesuré par des méthodes chromatographiques, colorimétriques ou enzymatiques.

### 1. Méthodes chromatographiques

La chromatographie gaz-liquide peut permettre le dosage du cholestérol plasmatique. Les meilleures méthodes utilisent des colonnes capillaires après triméthylsilylation, ce qui permet de séparer le cholestérol des composés très voisins comme le cholestanol. Cette méthode, couplée à la spectrométrie de masse est considérée comme méthode de référence par la Société française de biologie clinique.

### 2. Méthodes colorimétriques

Ces méthodes nécessitent une extraction préalable. La mesure du cholestérol se fera en trois étapes : extraction, saponification et coloration. Il existe également des méthodes en deux étapes, qui éliminent la saponification, rendant possible l'automatisation. Des méthodes directes ont également été développées en ajoutant un agent stabilisant (acide arylsulfonique dissous dans l'acide acétique ou le sulfate de sodium) qui permet la solubilisation des protéines associées dans le réactif.
La coloration est obtenue par la réaction de Liebermann (développement d'une coloration verte en présence d'anhydride acétique et d'acide sulfurique) ou la réaction de Zak (développement d'une coloration rouge en présence d'acide acétique, de chlorure ferrique et d'acide sulfurique).
Ces réactions ne sont pas spécifiques et il existe de nombreuses interférences (autres stérols, bilirubine, médicaments, etc.). De plus, à 620 nm, les esters de cholestérol donnent une coloration plus intense que le cholestérol libre lorsque l'extraction a eu lieu dans le chloroforme.
Ces méthodes manquent donc de spécificité et de reproductibilité, surtout lorsqu'elles sont appliquées directement au sérum. Dans ce dernier cas, elles donnent le plus souvent des résultats supérieurs de 10 % à ceux de la méthode de référence.

### 3. Méthodes enzymatiques

Le dosage enzymatique du cholestérol repose sur l'utilisation d'une cholestérol estérase et d'une cholestérol oxydase (*fig. 1*). Les différentes méthodes varient selon la procédure utilisée pour la mesure du peroxyde d'hydrogène produit.
La réaction de Trinder peut être utilisée. Dans ce cas, en présence de quatre aminopyrines, de phénol et de peroxydase, on peut former une quinone qui présente un maximum d'absorption à 500 nm.
D'autres utilisent la réaction de Hantzch, qui permet l'oxydation du méthanol en formaldéhyde par le peroxyde d'hydrogène. Le formaldéhyde réagit ensuite avec des ions ammonium et de l'acétyl acétone pour former une lutidine mesurable par une méthode colorimétrique ou fluorimétrique.

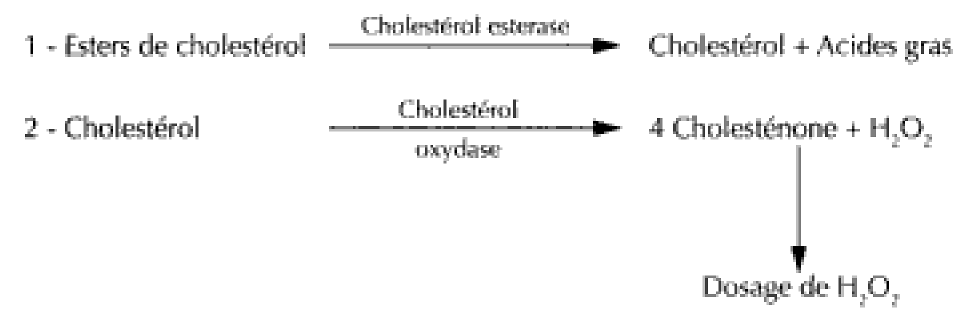



**Figure 1.** Dosage enzymatique du cholestérol

On peut également mesurer directement le peroxyde d'hydrogène formé par une méthode potentiométrique. Enfin, il existe des méthodes mesurant la consommation d'oxygène au cours de l'oxydation du cholestérol par une méthode polarographique. Les méthodes enzymatiques représentent les méthodes de choix pour le laboratoire de routine car elles sont généralement très reproductibles. Les résultats sont également très bien corrélés avec la méthode de référence. La spécificité est aussi très bonne. La biluribine et l'hémoglobine n'interfèrent pas. Les autres stérols et les médicaments ont une influence négligeable.

### 4. Mesure du cholestérol libre et estérifié

Le cholestérol libre représente approximativement 10 % du cholestérol total plasmatique. Le cholestérol libre peut être séparé du cholestérol estérifié par chromatographie sur couche mince ou chromatographie liquide haute performance. Cependant, en laboratoire, il est plus facile de doser le cholestérol libre par une méthode enzymatique dans laquelle n'intervient pas le cholestérol estérase. Le cholestérol estérifié peut être obtenu par différence. Le dosage du cholestérol estérifié peut être utile pour rechercher un déficit en LCAT, enzyme d'estérification du cholestérol.

## B. Mesure des glycérides

### 1. Méthodes chimiques

La mesure des glycérides s'effectue en trois étapes : extraction, hydrolyse alcaline et mesure du glycérol libéré.

L'extraction peut s'effectuer selon la méthode classique d'extraction des lipides (chloroforme-méthanol, isopropanol). Cette méthode d'extraction n'étant pas sélective, il faudra éliminer les substances interférentes par absorption sur zéolite, florisil, diatomée, sulfate de cuivre, bentonite, etc.

Dans les méthodes récentes, les glycérides sont extraits sélectivement par partition de phase entre deux solvants (isopropanol-nonane, isopropanol-heptane). Les glycérides sont généralement hydrolysés par saponification ou transestérifiés à l'aide d'une solution alcoolique de sodium ou de potassium ou de méthylate de sodium. Le glycérol libéré est évalué soit directement, soit, le plus souvent, après oxydation périodique. Dans ce cas, le glycérol est oxydé en formaldéhyde, qui peut être mesuré par différentes méthodes. La méthode la plus courante est la méthode de Hantzch qui permet la formation lutidine par condensation du formaldéhyde avec l'acétyl-acétone et des ions ammonium. La lutidine peut être mesurée soit par colorimétrie à 410 nm, soit par fluorescence.

### 2. Méthode enzymatique

Le dosage enzymatique des glycérides peut s'effectuer après hydrolyse alcaline des glycérides et extraction des lipides. Cependant, les méthodes récentes utilisent une lipase associée à une protéase comme agent hydrolytique. Le glycérol libéré peut être dosé par trois méthodes enzymatiques. La consommation enzymatique du glycérol conduit à une consommation de NADH (nicotinamide adénine dinucléotide) proportionnelle à la quantité de glycérol. Cette consommation est appréciée par photométrie à 340 nm ou par fluorimétrie.

## C. Dosage des autres lipides plasmatiques

D'autres lipides plasmatiques peuvent également être mesurés, bien que leur dosage soit moins couramment utilisé en biologie clinique. Il s'agit des phospholipides.
Les phospholipides totaux peuvent être dosés sur la base de leur contenu en phosphore. Dans ce cas, après extraction des lipides ou précipitation, les phospholipides sont carbonisés et le phosphore libéré forme un complexe phosphomolybdique ou phosphomolybdovanadique mesuré par colorimétrie.
Les phospholipides choliniques peuvent être dosés par des méthodes enzymatiques. La choline, libérée par action d'une phospholipase, est oxydée par une choline oxydase et le peroxyde d'hydrogène formé est mesuré par colorimétrie à 500 nm après formation d'une quinone.

# VIII. Analyse des lipoprotéines

Les lipides n'étant pas solubles dans l'eau, ils circulent dans le plasma en association à des protéines, appelées « apolipoprotéines ». L'ensemble lipides-protéines forme un complexe moléculaire appelé « lipoprotéine. » Les lipoprotéines se distinguent par des rapports lipide-protéine, des compositions protéiques et des tailles variables qui leur confèrent des propriétés différentes. Les méthodes d'analyse des lipoprotéines sont donc fondées sur leurs critères physicochimiques ou sur leur contenu en apolipoprotéines.

## A. Méthodes fondées sur les critères physicochimiques

Les lipoprotéines peuvent être séparées selon leur charge électrique, leur densité, leur taille ou leur interaction avec les polyanions ou les lectines.

### 1. Séparation selon la charge électrique

La séparation des lipoprotéines selon la charge électrique a été effectuée pour la première fois par électrophorèse sur papier. Les supports actuellement utilisés sont soit l'acétate de cellulose, soit l'agarose.
L'électrophorèse sur acétate de cellulose est certainement la technique la plus utilisée pour la séparation des lipoprotéines plasmatiques. La migration, en tampon veronal de pH 8,6, permet de séparer, de la cathode vers l'anode, les bêta-, les pré-bêta- et les

alpha-lipoprotéines correspondant respectivement aux LDL, VLDL et HDL. La Lp(a), migre en position pré-bêta et ne peut donc pas être individualisée par ce type d'électrophorèse. Les chylomicrons, s'ils sont présents, migrent en traînée en grande partie dans la zone des pré-bêta-lipoprotéines, les très gros restant au point de dépôt. La coloration se fera par des colorants lipophiles (rouge ciba, noir Soudan, etc.).
L'électrophorèse sur gel d'agarose est très utilisée pour mettre en évidence la LpX, lipoprotéine anormale apparaissant dans le sérum de sujets présentant un ictère par obstruction. La LpX, du fait du flux d'électroendosmose important sur ce type de support, se déplace vers la cathode et se sépare ainsi des autres types de lipoprotéines. La révélation peut se faire par précipitation par les polyanions ou par un immunosérum (ou sérum immunisant) anti-LpX.

## 2. Séparation en fonction de la taille et de la charge

L'utilisation d'un gel de polyacrylamide permet un tamisage moléculaire et l'électrophorèse sur ce type de support permet donc de faire intervenir la taille moléculaire en plus de la charge. De ce fait, la migration permet de séparer, de la cathode vers l'anode, les VLDL, les LDL et les HDL. Les chylomicrons restent au point de dépôt. Il s'agit le plus souvent d'un gel de polyacrylamide à gradient discontinu de concentration :
- gel supérieur à 2 % d'acrylamide, destiné à retenir les chylomicrons ;
- gel de concentration à 3,5 % d'acrylamide.

Ces gels sont préparés en tube ou sur film de plastique (plaques d'acrylamide-agarose). Les lipoprotéines peuvent être précolorées par le noir Soudan acétylé ou succinilé, ou le diformazan de nitrobleu de tétrazolium.
Par cette méthode, la Lp(a) migre sous forme d'une bande bien individualisée au-dessus de celle des LDL. Une bande supplémentaire, localisée juste au-dessous de celle des VLDL, à la surface du gel de séparation, peut être retrouvée dans certains sérums riches en triglycérides. Il s'agit des IDL (LDL 1), formées lors du catabolisme des VLDL en LDL. Il est possible d'effectuer une intégration densitométrique des différentes bandes. Cependant, il n'existe aucune relation linéaire entre la concentration en lipoprotéine et l'intensité de la coloration. Il doit donc être bien gardé à l'esprit que cette méthode de séparation des lipoprotéines ne permet qu'une analyse qualitative et ne doit être interprétée qu'en connaissance des résultats du bilan lipidique.

## 3. Séparation en fonction de la densité

Les différentes proportions entre lipides et protéines dans les lipoprotéines leur confèrent des densités variables, inférieures à celle des autres protéines du sérum, ce qui permet leur séparation par flottation dans un champ d'accélération très élevé. Cette technique d'ultracentrifugation analytique est considérée comme la technique de référence mais est réservée aux laboratoires spécialisés.

## 4. Séparation par précipitation sélective

Ces méthodes ont le plus souvent été développées pour éliminer les lipoprotéines de basse et très basse densité (VLDL et LDL) et permettre un dosage rapide du cholestérol HDL. Il est supposé que toutes les lipoprotéines contenant l'apolipoprotéine B sont précipitées et que les lipoprotéines ne la contenant pas restent en solution. Le

mélange précipitant peut être constitué de polyanions organiques (héparine) ou inorganiques (phosphotungstate de sodium) associés à des cations divalents ou des macromolécules non ioniques (polyvinyl-pyrolidone, polyéthylèneglycol, concanavaline A). La Société française de biologie clinique recommande l'utilisation du mélange de phosphotungstate de sodium et de chlorure de manganèse. Les résultats obtenus avec cette méthode sont bien corrélés avec ceux de l'ultracentrifugation. Cependant, même si le contenu en cholestérol des fractions ainsi séparées est le même que celui obtenu après ultracentrifugation, il n'est pas du tout certain que les HDL isolées par cette technique et celles isolées par ultracentrifugation correspondent au même mélange du point de vue moléculaire. Malgré ces restrictions, leur simplicité d'emploi a conduit à une large utilisation en laboratoire de biologie clinique.

## B. Mesure directe du cholestérol HDL

Récemment, des méthodes permettant le dosage direct du cholestérol HDL, sans précipitation préalable des lipoprotéines de basse et très basse densité, ont été développées. Elles présentent l'avantage de permettre une automatisation complète du dosage, ce qui évite les sources d'erreur liées aux étapes manuelles. Le principe de ces méthodes directes repose sur le dosage enzymatique du cholestérol comme décrit ci-dessus, un additif rendant les lipoprotéines de basse et très basse densité inaccessibles aux enzymes. Différents additifs et différentes méthodologies sont actuellement disponibles :

- l'utilisation de sulfates d'α-cyclodextrine et de dextrane comme premier réactif permet la formation de complexes hydrosolubles avec les VLDL, les LDL et, éventuellement, les chylomicrons, qui deviennent ainsi insensibles à l'action des enzymes contenues dans le deuxième réactif, dont les propriétés catalytiques ont été modifiées par couplage avec du polyéthylèneglycol ;
- l'adsorption sélective de polyanions synthétiques contenus dans un premier réactif sur les VLDL, LDL et chylomicrons permet de former des complexes résistants aux détergents contenus dans le deuxième réactif. Ceux-ci autorisent en revanche l'accessibilité des enzymes permettant le dosage du cholestérol aux seules HDL ;
- des anticorps polyclonaux reconnaissant les lipoprotéines contenant l'apo B forment avec elles des complexes qui ne réagissent pas avec les enzymes permettant le dosage du cholestérol. Ainsi, seul le cholestérol contenu dans les HDL est-il mesuré.

Ces méthodes sont simples et précises. Elles sont, pour la plupart, bien corrélées avec la méthode classique de précipitation sélective décrite ci-dessus.

## C. Méthodes fondées sur le contenu en apolipoprotéines

La découverte des propriétés biologiques importantes des apolipoprotéines (activation ou inhibition des enzymes, reconnaissance par les récepteurs) a conduit à l'utilisation des apolipoprotéines comme marqueurs des lipoprotéines. Petar Alaupovic a ainsi proposé la détermination d'un profil apolipoprotéinique pour le typage des dyslipoprotéinémies. De nombreux auteurs ont ensuite montré que le dosage des apolipoprotéines représente un des meilleurs moyens de révéler des changements dans la distribution des particules lipoprotéiques.

Les méthodes utilisées en laboratoire de biologie clinique sont des méthodes immunologiques. Elles font appel à l'immunoprécipitation en milieu liquide, à l'immunodiffusion ou à l'utilisation d'anticorps marqués (enzymo-immunologie, radio-immunologie ou fluoro-immunologie).

## 1. Immunoprécipitation en milieu liquide

L'incubation d'une dilution adéquate du plasma avec un immunosérum spécifique d'une apolipoprotéine donnée permet une précipitation stœchiométrique. Le précipité ainsi formé peut être apprécié par néphélémétrie, c'est-à-dire par la mesure de la dispersion de la lumière au contact de l'immunoprécipité. L'utilisation de cette méthode est limitée par la dispersion non spécifique des sérums hypertriglycéridémiques. Cependant, quelques méthodes de dosage des apolipoprotéines AI et B font appel à ce principe. Une nouvelle génération de techniques néphélémétriques est apparue récemment. Il s'agit de particules de latex sensibilisées par liaison covalente avec un anticorps. Le principal avantage de cette méthode réside dans l'utilisation de plus hautes dilutions, ce qui limite l'interférence de la turbidité du sérum.

## 2. Immunodiffusion et électro-immunodiffusion

La technique d'immunodiffusion radiale de Mancini a été largement adaptée au dosage des apolipoprotéines. Dans cette méthode, on laisse diffuser l'antigène dans un gel dans lequel on a incorporé un immunosérum spécifique de l'apolipoprotéine à doser. Il se crée alors un gradient de concentration de l'antigène et quand cette concentration est équivalente à celle de l'anticorps incorporé, un cercle de précipitation se forme. La surface de ce cercle est proportionnelle à la concentration en apolipoprotéines. L'électro-immunodiffusion de Laurell est certainement la technique qui a été la plus utilisée pour le dosage des apolipoprotéines. Grâce à un champ électrique, on provoque le déplacement des protéines dans une gélose contenant une concentration constante d'immunosérum spécifique de l'apolipoprotéine à doser. Pendant ce déplacement, une diffusion de l'apolipoprotéine à doser se produit dans un sens perpendiculaire à celui de l'électrophorèse. À équivalence de titre entre l'apolipoprotéine et l'anticorps, il se forme un précipité. L'apolipoprotéine non précipitée continue de se déplacer sous l'influence du champ électrique et précipite un peu plus loin. On réalise donc un épuisement régulier de l'apolipoprotéine par l'anticorps et il se forme un arc de précipitation en forme de fusée dont la surface est proportionnelle à la concentration en apolipoprotéine.

## 3. Utilisation de molécules marquées

### a) Méthodes radio-immunologiques

Ces méthodes utilisent la compétition entre l'apolipoprotéine marquée à l'iode 125 et l'apolipoprotéine à doser vis-à-vis d'un anticorps spécifique. La radioactivité fixée à l'anticorps est donc une fonction inverse de la concentration en apolipoprotéine de l'échantillon. Les méthodes utilisées diffèrent par le principe de séparation des antigènes libres et liés. On peut utiliser un deuxième anticorps en solution ou absorbé sur un support insoluble (billes) pour précipiter le premier mais les méthodes les plus

simples sont sans doute celles qui utilisent un premier anticorps déjà absorbé sur un support insoluble (paroi du tube ou de la plaque de microtitration, bille, ailette...). Les méthodes radio-immunologiques ont été parmi les premières à être utilisées pour le dosage des apolipoprotéines AI et B.

### b) Méthodes enzymo-immunologiques

Ces méthodes remplacent le traceur radioactif par une enzyme (peroxydase, glucose oxydase, phosphatase alcaline). La réaction immunologique est suivie par une réaction indicatrice qui permet la détection spectrophotométrique de l'activité enzymatique liée au complexe antigène-anticorps. Le plus souvent, c'est l'anticorps qui est marqué par l'enzyme.

Initialement, la méthode réalisait une compétition entre l'apolipoprotéine présente dans l'échantillon à doser et l'apolipoprotéine adsorbée sur un support insoluble pour l'anticorps marqué par la peroxydase en solution. De plus en plus, on utilise des méthodes dites « sandwich » où l'apolipoprotéine retenue par un anticorps absorbé sur un support insoluble est mesurée par un second anticorps marqué à la peroxydase.

### c) Méthodes fluoro-immunologiques

Ces méthodes devraient être utilisées dans un avenir très proche. Le principe est le même que le précédent mais le marqueur est ici fluorescent. Le principal inconvénient de cette méthode réside dans la fluorescence parasite du plasma. Cependant, l'amélioration des systèmes de détection et l'utilisation de fluorophores nouveaux (terres rares) permettront de résoudre ce problème.

Des procédés voisins de la fluorescence seront probablement aussi développés. Il s'agit de la chimioluminescence, où l'énergie d'excitation est fournie par une réaction chimique et de la bioluminescence, où l'énergie est fournie par des organismes vivants (micro-organismes).

### d) Problèmes relatifs aux anticorps utilisés

À la différence des autres protéines plasmatiques, les apolipoprotéines sont associées à des lipides et peuvent être plus ou moins enfouies dans la masse lipidique. Les déterminants antigéniques peuvent donc être plus ou moins accessibles selon la complexité de la lipoprotéine concernée. Les résultats varient donc beaucoup en fonction du lot d'anticorps utilisé, lorsqu'il s'agit d'anticorps polyclonaux. L'utilisation d'anticorps monoclonaux qui reconnaissent un épitope exprimé dans toutes les lipoprotéines (anticorps PAN) ou de mélanges d'anticorps monoclonaux permet de résoudre ce problème.

### e) Problèmes d'étalonnage

Les apolipoprotéines purifiées peuvent s'agréger lorsqu'elles sont en solution aqueuse. Leur préparation et leur conservation requièrent l'addition d'urée ou de guanidine. Pour le dosage des apolipoprotéines, il est donc préférable d'utiliser un mélange de plasma additionné de conservateur, pour lequel on aura au préalable déterminé le contenu en apolipoprotéine. Les apolipoprotéines purifiées n'ayant pas la même réactivité immunologique que celles du plasma, l'étalonnage d'un plasma par rapport à un étalon primaire d'apolipoprotéine donne forcément une valeur fausse dans l'absolu. On s'oriente donc vers l'utilisation d'une valeur arbitraire donnée à un mélange de quelques milliers de plasma comme étalon international de référence.

D'autre part, la taille des lipoprotéines pouvant influencer les résultats des méthodes en gel, il est important d'utiliser des étalons comparables aux échantillons à analyser sur le plan de la taille des lipoprotéines.

#### f) Valeurs physiologiques habituelles

Seuls les dosages des apolipoprotéines B et AI sont couramment utilisés en laboratoire de biologie clinique. En fonction d'études réalisées sur sujets coronarographiés, on considère qu'il y a risque artériel si la concentration sérique en apolipoprotéine B dépasse 1,30 g/L. Les études épidémiologiques ont montré qu'il existait une relation entre la diminution de la concentration sérique en apolipoprotéine AI et le risque d'athérosclérose. Les valeurs physiologiques habituelles chez l'adulte sont comprises entre 1,10 et 1,60 g/L.

## Conclusion

Le bilan lipidique devra donc toujours débuter par un dosage du cholestérol et des triglycérides plasmatiques. Il pourra être complété par un dosage du cholestérol-HDL suivi du calcul du cholestérol-LDL et éventuellement des apolipoprotéines pour préciser le risque cardiovasculaire, notamment dans le cas d'une hypercholestérolémie modérée, ou pour affirmer le type d'hyperlipoprotéinémie. L'électrophorèse des lipoprotéines est parfois nécessaire pour préciser le type d'hyperlipoprotéinémie (type III, notamment) ou pour mettre en évidence la présence de LpX.

## L'essentiel de la question

Les hyperlipidémies constituent un des principaux facteurs prédisposant à l'apparition des maladies cardiovasculaires, en particulier de l'insuffisance coronaire. Le dépistage et le traitement efficace de ces pathologies sont donc importants pour une prévention efficace. Le dépistage doit être réalisé systématiquement et la décision d'une prise en charge thérapeutique est fonction des tests biochimiques réalisés dans le cadre du risque global d'un sujet vis-à-vis des maladies cardiovasculaires.

La classification des hyperlipidémies repose sur les concentrations en lipoprotéines à très basse, basse et haute densités (VLDL, LDL et HDL). Ces concentrations sont appréciées par le contenu en cholestérol de certaines d'entre elles (LDL, HDL) ou par la concentration des triglycérides pour les VLDL, la majeure partie des triglycérides plasmatiques étant transportés par ces lipoprotéines.

L'hypercholestérolémie est définie par une élévation des LDL, les VLDL (et donc les triglycérides) étant normaux. La valeur au-delà de laquelle une prise en charge thérapeutique est nécessaire est fonction du risque du sujet. En cas de risque cardiovasculaire patent, un traitement diététique et éventuellement médicamenteux sera institué dès lors que le LDL-C est supérieur à 1,30 g/L, cette limite étant relevée à 1,60 g/L ou plus en fonction du risque cardiovasculaire. Les hypercholestérolémies sont le résultat d'une interaction entre facteurs d'environnement et facteurs génétiques. L'hypercholestérolémie familiale est une forme particulière et sévère d'hypercholestérolémie dépendante exclusivement d'un facteur génétique.

L'augmentation des triglycérides s'observe lors d'une hyperlipidémie mixte (augmentation des VLDL et des LDL) ou lors d'une hypertriglycéridémie pure (augmentation des VLDL, les LDL étant normales). Dans les deux cas, deux facteurs favorisant doivent être recherchés, un syndrome métabolique associant un surpoids androïde et une résistance à l'insuline et/ou une consommation excessive d'alcool. La présence de facteurs génétiques plus ou moins bien connus permet d'isoler certaines formes d'hyperlipidémies augmentant les triglycérides : hyperlipidémie de type III, hyperlipidémie familiale combinée, déficit en lipoprotéine lipase.
L'hypoalphalipoprotéinémie correspond à un HDL-C inférieur à 0,25 g/L. Elle peut s'observer dans une des hyperlipidémies précédentes (surtout en cas d'augmentation des triglycérides) ou de façon isolée. La prise en charge de cette anomalie nécessite un avis spécialisé.
Les hyperlipidémies secondaires correspondent à l'apparition ou à l'accentuation d'une hyperlipidémie lors d'une pathologie intercurrente non consécutive à l'hyperlipidémie. Les principales causes sont l'hypothyroïdie, l'insuffisance rénale et la cholestase. Seule l'hypothyroïdie fait découvrir une hyperlipidémie.
L'analyse des lipoprotéines peut être très approfondie. En biologie clinique, seuls quelques tests simples, bien standardisés, sont nécessaires. Les dosages du cholestérol et des triglycérides sont essentiels, ainsi que celui du HDL-C dont la méthode de référence utilise une précipitation des lipoprotéines contenant l'apolipoprotéine B. Le LDL-C est calculé par la formule de Friedewald, valable quand les triglycérides sont inférieurs à 4 g/L.

### *Pour en savoir plus*


- Luc G., Fruchart J.-C. Nouvelles Méthodes d'exploration des lipides. *Presse médicale* 1994 ; 23 : 1446-9.
- Luc G., Lecerf J.-M., Bard J.-M., Hachulla E. *et al. Cholestérol et athérosclérose*, Paris, Abrégé Masson.
- Egloff M., Léglise D., Duvillard L, Steinmetz J. *et al.* Évaluation multicentrique sur différents automates d'analyses de trois méthodes de dosage direct du cholestérol-HDL. *Annales de biologie clinique* 1999 ; 57.
- Luc G. Dossier hyperlipidémies. *La Revue du praticien* 2000 ; 14 : 301-12.
- Bruckert E., Paillard F., Luc G. *et al.* Le bilan lipidique à demander en pratique courante. *Le Quotidien du médecin* 1995 ; 570122-23.

# Pathologie rénale

F. SCHMITT, Laboratoire de biologie, Centre hospitalier de Bretagne Sud, Lorient.

*Comme cela a été abordé dans le chapitre consacré à la physiologie rénale, le rein est le principal garant de l'homéostasie hydrosodée, notamment grâce à sa fonction excrétrice (eau, électrolytes et déchets du métabolisme azoté). En dehors de cette activité, le rein possède également un certain nombre d'activités endocrines et métaboliques participant ainsi à de nombreuses régulations dans l'organisme. On comprend mieux dès lors que les différentes affections des reins donnent souvent lieu à tout un ensemble de signes cliniques, de symptômes et d'anomalies biologiques associées en syndromes. Ces syndromes ont une utilité diagnostique dans la mesure où ils permettent, comparativement aux signes individuels qui les composent, de limiter l'étiologie.*
*Motivée par des troubles fonctionnels, une altération de l'état général, la présence d'un symptôme précis ou encore une anomalie lors d'un dépistage systématique, une exploration fonctionnelle rénale sera conduite dans un ordre logique. Une évaluation de routine, mettant en œuvre des examens d'usage courant, confrontée à une exploration radiologique (échographie, urographie intraveineuse) suffit généralement à établir un diagnostic. Mais, dans certains cas particuliers, l'exploration peut faire appel à des épreuves dynamiques biochimiques et/ou isotopiques, des examens immuno-histologiques d'interprétation plus délicate et nécessitant une structure spécialisée. Dans une première partie seront abordés les principaux examens mis en œuvre dans le cadre d'une exploration fonctionnelle rénale et dans une seconde partie, la description de quatre grandes pathologies rencontrées en néphrologie : les insuffisances rénales aiguës et chroniques, le syndrome néphrotique et les glomérulonéphrites aiguës.*
*Remarque : certains examens traités dans d'autres questions de biologie clinique ne seront que cités. D'autres, plus spécifiques, seront détaillés de manière plus approfondie.*

# I. Exploration fonctionnelle rénale

L'exploration fonctionnelle rénale ne prétend pas explorer la totalité des fonctions rénales, mais répond essentiellement à deux objectifs :

- évaluer la fonction globale du rein et préciser l'importance d'une éventuelle réduction néphronique. L'appréciation du nombre de glomérules fonctionnels est fournie par la mesure du débit de filtration glomérulaire, le nombre de tubules actifs étant apprécié par la mesure des Tm (transfert maximal de substance pouvant être soit sécrétée – Tm de sécrétion – soit réabsorbée – Tm de réabsorption). Si la détérioration de la fonction glomérulaire entraîne obligatoirement une altération de la fonction tubulaire, il existe en revanche des anomalies fonctionnelles des tubules en dehors de toute atteinte glomérulaire ;
- étudier isolément les grandes fonctions tubulaires rénales parmi lesquelles :
  - la fonction de concentration-dilution des urines ;
  - la fonction d'acidification ;
  - la fonction de réabsorption ou de sécrétion de différents constituants de l'urine (glucose, phosphates…).

## A. Exploration fonctionnelle de routine

### 1. Examens biochimiques sanguins

#### a) Méthodes d'estimation du débit de filtration glomérulaire (DFG)

■ *Créatininémie*

En routine clinique, la détermination de la créatininémie reste actuellement l'examen le plus largement utilisé pour apprécier la fonction rénale. Pour un individu donné, la production de créatinine est fonction de la masse musculaire et des apports alimentaires. Elle est essentiellement éliminée par voie rénale, par filtration glomérulaire. La valeur normale chez l'adulte varie de 50 à 115 µmol/L et de 30 à 70 µmol/L chez l'enfant. La créatininémie n'est cependant pas le marqueur idéal du débit de filtration glomérulaire (DFG) :

- certains facteurs sont susceptibles de faire varier le taux plasmatique de créatinine : techniques de dosage, facteurs liés au métabolisme (masse musculaire, régime alimentaire), interférences médicamenteuses ;
- la relation entre créatininémie et DFG n'est pas linéaire. La créatinine plasmatique ne s'élève que lorsque le DFG est déjà diminué de moitié ;
- la créatinine est filtrée au niveau du glomérule mais subit également un processus de sécrétion tubulaire. Cette sécrétion est relativement faible pour une fonction rénale normale (10 à 20 % de la créatinine éliminée). Elle est réduite par certains médicaments (cimétidine, triméthoprine…) et majorée en cas d'insuffisance rénale.

La créatininémie est donc un marqueur imparfait du DFG mais reste facile de réalisation. Seuls pourront être comparés des résultats successifs obtenus avec la même méthode de dosage chez un patient. L'interprétation devra tenir compte des différents facteurs de variations cités ci-dessus.

■ *Clairance de la créatinine*

L'appréciation du débit de filtration glomérulaire (DFG) se fait en routine clinique par la mesure de la clairance de la créatinine endogène, mesurée sur 24 heures ou estimée à l'aide de la formule de Cockroft et Gault :

- clairance mesurée : elle est calculée à partir de la formule $C = U \times V/P$ (U = concentration urinaire de la créatinine, P = concentration plasmatique de la créatinine, V = débit urinaire sur 24 heures). Cette détermination suppose une mesure d'une part de la créatininémie et, d'autre part, de la créatinine urinaire dans un échantillon minuté des urines. En général, elle s'effectue sur les urines de 24 heures ou, dans certains cas particuliers, sur des périodes plus courtes (4 heures). La valeur normale moyenne de la clairance de la créatinine est de 120 ml/min rapportée à 1,73 $m^2$ de surface corporelle. L'un des principaux problèmes rencontrés dans la réalisation de cet examen est l'erreur faite sur le recueil urinaire (recueil incomplet sur 24 heures ou vessie non complètement vidée). En réalité, du fait de l'existence d'une sécrétion tubulaire, la clairance de la créatinine surestime toujours le DFG. Si cette surestimation reste négligeable en cas de fonction rénale normale, elle peut devenir importante en cas d'insuffisance rénale puisque la sécrétion tubulaire de créatinine augmente au fur et à mesure de l'aggravation de l'atteinte rénale ;

- clairance estimée par la formule de Cockroft et Gault : elle nécessite de connaître le poids, le sexe et l'âge du patient :

$$\frac{\left(140\ \text{âge}\left[\text{années}\right]\right)\times\left(\text{poids (kg)}\right)\times 1{,}23\ (\text{homme})\ \text{ou}\ 1{,}04\ (\text{femme})}{\text{créatininémie}\ (\mu\text{mol/L})}$$

  La performance de cette formule est inconnue chez l'obèse et peu évaluée chez le sujet âgé. Il est donc nécessaire d'avoir des données complémentaires de mesure du DFG pour définir le seuil d'insuffisance rénale dans ces deux populations. La normalisation à la surface corporelle améliore la performance de prédiction de l'équation. Depuis 2002, la Haute Autorité de Santé (HAS) recommande au biologiste de donner une estimation du DFG par la formule de Cockroft et Gault pour chaque demande de créatininémie.

■ *Cystatine C*

Ce polypeptide endogène est produit de façon constante dans l'organisme et éliminé exclusivement par filtration glomérulaire. Son taux plasmatique est le reflet de la fonction rénale et la cystatine C se révèle être un marqueur sensible pour détecter une insuffisance rénale débutante. Le coût élevé de son dosage en limite l'utilisation en pratique courante.

■ *Urée*

Le dosage de l'urée plasmatique est souvent associé au dosage de la créatininémie puisqu'elle est librement filtrée par le glomérule. Néanmoins, une augmentation de l'urée plasmatique ne témoigne pas spécifiquement d'une atteinte rénale. En effet, sa concentration dépend non seulement de la fonction rénale mais aussi de la diurèse, des apports azotés alimentaires et du catabolisme protidique endogène. Une augmentation de l'urémie peut s'observer dans les régimes riches en protéines, lors d'apports hydriques faibles (diminution de la diurèse augmentant la réabsorption tubulaire de l'urine), lors d'exagération du catabolisme protidique (infections, brûlures, fièvre…). Inversement, une urée normale ne traduit pas forcément une fonction rénale normale. Dans le sang, les concentrations d'urée sont comprises entre 2,5 et 7,5 mmoles/L.

**b) Ionogramme**

La détermination des ions $Na^+$, $K^+$, et $Cl^-$ est indispensable pour apprécier l'équilibre hydroélectrolytique dont le rein est le principal garant.

*Le sodium* est le principal cation du liquide extracellulaire et les sels de sodium constituent la quasi-totalité de l'osmolalité plasmatique. *La natrémie* reflète l'état d'hydratation du secteur intracellulaire.

*Le potassium* est le principal cation intracellulaire. La concentration extracellulaire est faible et maintenue dans d'étroites limites (3,5 à 4,5 mmol/L). *L'hyperkaliémie* est le désordre électrolytique principal de l'insuffisance rénale aiguë et reflète l'impossibilité du rein à excréter le potassium. À partir de 6,5 mmol/L, le pronostic vital est en jeu. Le potassium provient à la fois d'une destruction cellulaire et d'une sortie intracellulaire sous l'influence de l'acidose. La kaliémie doit toujours être interprétée en fonction de l'équilibre acido-basique.

*Les bicarbonates* renseignent sur les désordres acido-basiques, une concentration abaissée étant, en néphrologie, la conséquence d'une acidose métabolique.

La détermination des ions $Na^+$, $K^+$, $Cl^-$ et est indispensable pour apprécier l'équilibre hydroélectrolytique dont le rein est le principal garant.
Le sodium est le principal cation du liquide extra-cellulaire et les sels de sodium constituent la quasi-totalité de l'osmolalité plasmatique. La natrémie reflète l'état d'hydratation du secteur intracellulaire.

### c) Autres paramètres

*Calcémie et phosphorémie* : deux paramètres rapidement modifiés dans l'insuffisance rénale chronique. La calcémie est à interpréter en fonction de la protidémie.
*Uricémie* : l'acide urique, produit de dégradation des purines, a une excrétion essentiellement rénale. Son augmentation est fréquente dans l'insuffisance rénale avancée.

## 2. Examens urinaires

### a) Diurèse

Chez un adulte normal, le volume d'urine émis par 24 heures oscille entre 750 et 2 000 ml. La diurèse est fonction de l'âge, du poids, du régime alimentaire, du climat et de l'activité physique. Une diurèse normale ne permet nullement de considérer la fonction rénale comme normale, l'excrétion de l'eau pouvant être conservée alors que la filtration glomérulaire est très diminuée.
On parle de *polyurie* pour des volumes supérieurs à 2 500 ml/24 h. Les principales étiologies sont la potomanie, le diabète insipide (carence en ADH), une insuffisance rénale aiguë, une insuffisance rénale chronique (diminution du nombre de néphrons fonctionnels), un diabète (on parle alors de polyurie osmotique).
Inversement, pour des volumes inférieurs à 600 ml/24 h, on parle *d'oligurie*, *l'anurie* caractérisant des volumes inférieurs à 100 ml/24 h (dans l'insuffisance cardiaque ou l'insuffisance rénale aiguë, par exemple). Oligurie et polyurie peuvent être physiologiques dans la mesure où la première est consécutive à une restriction des apports hydriques et la seconde à des apports élevés. Elles sont la conséquence d'une réponse physiologique du rein à des apports inusuels.

### b) Examen cytobactériologique des urines (ECBU)

#### ■ *Prélèvement*

Les urines sont recueillies (de préférence le matin), en milieu de miction, après toilette locale, dans un récipient stérile. Si l'examen est différé, le prélèvement est conservé à + 4 °C.

#### ■ *Étude du sédiment urinaire*

La cytologie urinaire est pratiquée sur les urines fraîches directement ou après centrifugation, par un examen en microscopie optique entre lame et lamelle.

*Hématies*

L'urine normale contient moins de 2 000 hématies par millilitre. L'hématurie est définie par la présence de sang en quantité anormale dans les urines. On parle d'hématurie microscopique lorsque le nombre d'hématies dépasse 10 000 par millilitre. Elle est non visible à l'œil nu et n'est dépistée que par les bandelettes réac-

tives (mélange peroxyde et orthotoluidine) utilisant les propriétés pseudo-peroxydasiques de l'hémoglobine. Pour un nombre supérieur à 500 000, il s'agit d'une hématurie macroscopique dont il faudra situer l'origine : vésicale, uréthrale ou rénale.
Qu'elle soit macroscopique ou microscopique, la valeur sémiologique de l'hématurie est la même et sa découverte rend indispensable la recherche de son étiologie.

*Leucocytes*
À l'état normal, l'urine en contient moins de 5 000 par millilitre. Une leucocyturie (> 10 000 éléments par millilitre) constituée de polynucléaires altérés signe le plus souvent une origine infectieuse. On parle de pyurie lorsque le nombre de globules blancs est supérieur à 100 000.

*Cellules épithéliales*
Arrondies lorsqu'elles proviennent des tubules rénaux, squameuses lorsqu'elles viennent des voies excrétrices, elles se trouvent en faible quantité dans l'urine.

*Cylindres*
Ils reproduisent le moule de la lumière du tube distal où ils se sont formés. De nature protéique, ils sont constitués pour l'essentiel de la protéine de Tamm-Horsfall, protéine sécrétée par l'épithélium de la branche large ascendante de Henlé et qui précipite selon les conditions physicochimiques locales. Lorsque le cylindre ne contient aucune inclusion (cylindre hyalin), il n'est pas pathologique. L'insertion dans le cylindre d'inclusions cellulaires a une grande valeur séméiologique : cylindres hématiques en faveur d'une hématurie d'origine parenchymateuse rénale, cylindre leucocytaire en faveur d'une inflammation interstitielle, cylindres épithéliaux en faveur d'une atteinte tubulaire.

*Cristaux*
Lorsqu'ils sont constitués de substances normalement présentes dans l'urine (sels de calcium, acide urique…), ils n'ont pas de signification pathologique. Ces sels, en fonction de leur concentration et du pH urinaire, peuvent précipiter (milieu acide : oxalates de calcium, urates de sodium ou d'ammonium ; milieu alcalin : phosphate de calcium). Si les cristaux sont constitués de substances normalement absentes de l'urine, ils ont une signification diagnostique (cristaux de cystine dans la cystinurie congénitale). Enfin, il est possible d'observer des cristaux de nature médicamenteuse.

### ■ *Bactériologie des urines*

Qualitativement, on recherche les germes directement sur le culot de centrifugation urinaire après coloration. Quantitativement, on effectue une numération des colonies microbiennes après ensemencement. Une contamination urinaire non pathologique est certaine lorsque le nombre de germes est inférieur à 10 000/ml. Au-delà de 100 000 germes par millilitre, l'infection urinaire est certaine. Entre ces deux valeurs, l'interprétation est délicate, sauf si la présence de polynucléaires altérés est associée. Le germe le plus fréquemment rencontré est le colibacille, mais le staphylocoque, l'entérocoque, le pyocyanique et différents protéus peuvent être responsables d'infections urinaires.

### c) Examens biochimiques urinaires

Tous les examens biochimiques de routine doivent être, dans la mesure du possible, effectués sur les urines de 24 heures. Dans certains cas particuliers (réanimation), les dosages s'effectuent sur un échantillon d'urines (miction). Les valeurs habituelles des différents paramètres couramment dosés dans les urines sont regroupées dans le *tableau 1*.

**Tableau 1.** Valeurs habituelles des principaux paramètres urinaires

| | |
|---|---|
| Sodium | 50 à 220 mmol/24 h |
| Potassium | 25 à 130 mmol/24 h |
| Chlore | 50 à 220 mmol/24 h |
| Créatinine | 8 à 16 mmol/24 h |
| Urée | 300 à 550 mmol/24 h |
| Acide urique | 1,5 à 4,5 mmol/24 h |
| Calcium | 2,5 à 8 mmol/24 h |

#### ■ *Électrolytes urinaires*

Le plus souvent, l'ionogramme urinaire se réduit à la seule détermination du sodium et du potassium. Physiologiquement, le bilan des entrées et des sorties est nul, d'où l'intérêt d'une détermination sur les urines de 24 heures. L'interprétation des résultats nécessite donc de bien connaître l'état clinique, le poids, les apports alimentaires, la prise éventuelle de médicaments (diurétiques, laxatifs...). Les variations des différents électrolytes n'ont d'intérêt clinique que dans l'établissement de bilans comparatifs avec les électrolytes plasmatiques. Dans certaines circonstances, un échantillon urinaire est suffisant pour la détermination du rapport sodium-potassium et l'établissement du diagnostic différentiel d'une atteinte rénale fonctionnelle ou organique. Le rapport Na-K est normalement > 1.

#### ■ *Protéinurie*

La protéinurie est la plus fréquente des anomalies urinaires, voire le seul signe d'une atteinte rénale. Très souvent réalisée à titre de dépistage, cette anomalie peut être isolée ou s'intégrer d'emblée dans une néphropathie. Elle accompagne la plupart des néphropathies. Le dépistage des protéinuries repose sur l'utilisation de bandelettes imbibées de bleu de bromophénol, toutes réactions positives ou douteuses devant être confirmées par un dosage quantitatif (colorimétrie par le rouge de pyrogallol, turbidimétrie par l'acide sulfosalicylique) permettant de connaître la concentration et le débit des protéines urinaires. Ces bandelettes ne détectent que l'albumine, pas les protéines anormales comme les chaînes légères d'immunoglobulines. Elles sont sujettes à des erreurs par faux positifs (PH urinaire alcalin, présence de pigments). En cas de positivité, la protéinurie sera confirmée puis quantifiée sur les urines de 24 heures. La protéinurie physiologique varie de 50 à 150 mg/24 h, composée pour 40 % d'albumine, 15 à 20 % de globulines et 30 à

40 % de protéine de Tamm-Horsfall, protéine synthétisée par le tubule distal. Le caractère pathologique d'une protéinurie est généralement suspecté lorque la protéinurie est > 300 mg/24 h. Les protéines urinaires peuvent être analysées qualitativement et les résultats comparés à ceux obtenus sur sérum par différentes techniques électrophorétiques (électrophorèse sur acétate de cellulose sur urine préalablement concentrée, électrophorèse sur gel de polyacrylamide). L'électrophorèse des protéines urinaires est indiquée en cas de protéinurie importante afin de préciser le caractère sélectif ou non d'une protéinurie. À l'aide de cette technique, il est possible de distinguer différents types de protéinuries.

**Protéinuries d'origine glomérulaire**

Elles sont liées à une altération de la membrane glomérulaire. La protéinurie, en général importante (> 3 g/24 h), peut être soit sélective (prédominance de l'albumine > 80 %) correspondant dans ce cas à des lésions glomérulaires peu importantes et réversibles sous traitement, soit non sélective lorsque toutes les fractions protidiques du plasma sont présentes. L'atteinte glomérulaire est alors plus sérieuse et souvent irréversible.

**Protéinuries d'origine tubulaire**

Elles contiennent essentiellement des globulines de faible poids moléculaire associées à 10 à 20 % d'albumine (β2-microglobuline, lysozyme, chaînes légères) et traduisent un défaut de réabsorption des protéines dû à des lésions tubulaires. Plusieurs bandes sont visibles à l'électrophorèse. La protéinurie dépasse rarement 1 ou 2 g/24 h.

**Protéinuries monoclonales ou prérénales**

Un pic étroit, homogène, migrant en position β ou γ témoigne de la présence dans les urines d'une globuline anormale. La plus fréquente est la protéine de Bence Jones, constituée de chaînes légères de type κ ou λ témoignant d'une gammapathie (myélome, Waldenström...). La capacité de réabsorption tubulaire est dépassée, et ces protéines sont excrétées dans les urines. L'immunofixation des protéines urinaires permet alors d'apprécier qualitativement et quantitativement la présence de chaînes légères urinaires. Les protéinuries sont en général permanentes, mais certaines, dites « protéinuries fonctionnelles » ont un caractère intermittent modéré (< 1 g/24 h) – protéinurie orthostatique, à l'effort, alimentaire, maladies infectieuses fébriles... Il n'y a, en général, dans ce cas, pas de lésion rénale associée. Ces protéinuries ont habituellement un caractère non sélectif.

**Microalbuminurie**

Une faible albuminurie, supérieure aux valeurs normales mais inférieure aux quantités habituellement décelables par les méthodes traditionnelles de dosage ou de dépistage, peut refléter de discrètes altérations de la perméabilité glomérulaire. Cette albuminurie quantitativement pathologique est appelée microalbuminurie. Le dosage peut être effectué sur les urines de 24 heures (résultat en mg/24 h), ou sur les urines de quatre heures (résultat en µg/min), ou sur un échantillon d'urine (résultat exprimé en rapport de concentration albuminurie-créatininurie exprimée en mg/mmol). La microalbuminurie se définit comme étant l'excrétion accrue d'albumine isolée (comprise entre 30 et 300 mg/24 h ou entre 20 à 200 µg/min),

seulement détectable par des méthodes de dosage immunologiques très sensibles (les méthodes classiques ont un seuil de dosage d'environ 100 à 150 mg/L). Sa valeur prédictive est surtout intéressante pour la surveillance de l'atteinte rénale chez le diabétique de type 1, ainsi que comme facteur de risque cardiovasculaire. En raison de la variabilité individuelle de l'excrétion urinaire de la microalbumine, l'examen doit être réalisé à trois reprises sur une période de six mois. Le diagnostic de microalbuminurie à caractère permanent est affirmé lorsque au moins deux des trois examens objectivent une microalbuminurie.

■ *Autres examens*

**Dosage de la créatinine**

Elle permet la mesure de la clairance de la créatinine. L'élimination urinaire de la créatinine est proportionnelle à la masse musculaire.

**Dosage de l'urée**

Le débit de l'urée urinaire est égal aux apports alimentaires auxquels s'ajoute le catabolisme endogène. Sa concentration renseigne sur le pouvoir de concentration du rein.

**Dosage de l'acide urique**

Essentiellement en cas de lithiase rénale.

## B. Exploration fonctionnelle spécialisée

### 1. Fonctions glomérulaires

#### a) Mesure de la filtration glomérulaire

La méthode de référence reste la clairance de l'inuline, substance exogène librement filtrée au niveau du glomérule et qui n'est ni sécrétée ni réabsorbée. Cette technique nécessite l'administration d'une dose de charge correspondant au volume de diffusion de l'inuline, puis une perfusion d'entretien continue maintenant la concentration plasmatique constante pendant toute la durée de l'épreuve. Plusieurs recueils minutés des urines et du sang du malade sont effectués afin de calculer le débit de filtration glomérulaire. La valeur normale est de 120 ± 15 ml/min rapportée à 1,73 $m^2$ de surface corporelle chez l'homme, et de 108 ± 14 ml/min/1,73 $m^2$ chez la femme. Cette méthode est de réalisation délicate et, en pratique, courante. On évalue le débit de filtration glomérulaire par la clairance de la créatinine endogène (déjà abordée dans le chapitre de physiologie rénale), en rappelant toutefois que, compte tenu d'un processus de sécrétion tubulaire de créatinine, cette valeur ne donne qu'une mesure approximative de la filtration glomérulaire. La clairance de la créatinine est comparable à celle de l'inuline chez un individu normal. Enfin, il faut rappeler que la créatininémie et le débit de filtration sont étroitement liés et que seule la détermination de la concentration plasmatique de créatinine permet de suivre la progression de l'atteinte rénale.

### b) Mesure du flux plasmatique rénal

Elle est déterminée de manière approximative par la clairance de l'acide para-aminohippurique (PAH) – voir « *Physiologie rénale* ». La valeur normale est de 600 ± 120 ml/min pour 1,73 m$^2$ de surface corporelle. De réalisation délicate, sa détermination s'effectue le plus souvent de façon conjointe avec la mesure du débit de filtration glomérulaire par la clairance de l'inuline et, du rapport de ses deux clairances, on peut déduire la fraction filtrée. Celle-ci est habituellement égale à :

$$\frac{\text{clairance inuline}}{\text{clairance PAH}}\text{, soit 0,2.}$$

## 2. Fonctions tubulaires

### a) Processus de réabsorption-sécrétion

La clairance d'une substance renseigne sur le comportement de cette substance au niveau tubulaire. Rappelons simplement que si la clairance de la substance est supérieure au débit de filtration glomérulaire, on admet une sécrétion tubulaire. Si elle est inférieure, on peut supposer une réabsorption tubulaire. La combinaison des différents mécanismes est possible mais reste difficile à juger par la seule mesure des clairances. Parmi les substances soumises à une réabsorption active, deux sont importantes dans l'exploration des fonctions tubulaires.

■ *Glucose*

Son transport est limité en valeur absolue et à partir d'une glycémie de 3 g/L ou 16 mmol/L (dite « seuil rénal »). L'excrétion devient proportionnelle à la quantité filtrée et le transport maximum du glucose (TmG) est atteint. Le TmG a une valeur de 350 mg/min. La mesure du TmG n'a plus beaucoup d'indications en pratique clinique, l'indication de choix restant la présence d'une glycosurie intermittente chez un individu dont le cycle glycémique est normal (mise en évidence d'un défaut de réabsorption tubulaire du glucose).

■ *Phosphates*

L'étude de leur réabsorption peut donner une indication sur le fonctionnement tubulaire proximal. Le taux de réabsorption des phosphates ou TRP est donné par :

$$\text{TRP} = 1 - \frac{\text{phosphaturie}}{\text{phosphatémie}} \times \frac{\text{créatininémie}}{\text{créatininurie}} \times 100$$

À l'état normal, le TRP est de 85 à 95 %.

### b) Fonction de concentration-dilution

Les transferts tubulaires d'eau entrent pour une part majeure dans la régulation de l'équilibre hydrique et les épreuves fonctionnelles testant cette adaptation seront souvent mises en œuvre pour apprécier les possibilités de dilution et de concentration des urines. Si la densité urinaire reste un assez bon reflet de la concentration urinaire, elle est actuellement remplacée par l'osmolarité urinaire et la clairance osmolaire.

### Osmolalité, clairance osmolaire, clairance de l'eau libre

L'osmolalité est la pression osmotique d'une solution rapportée au kilogramme d'eau. L'osmolarité est la pression osmotique rapportée au litre de solution. L'osmolalité plasmatique est normalement de 290 mOsm/kg. Physiologiquement, les variations de l'osmolalité plasmatique n'excèdent pas 1 ou 2 %. Face aux apports variables d'osmoles (charge alimentaire en $Na^+$, $K^+$, protéines) et aux apports hydriques, le rein assure cette régulation étroite en adaptant l'excrétion d'osmoles et d'eau libre. L'osmolalité urinaire, habituellement comprise entre 600 et 800 mOsm/kg, peut ainsi varier de 50 à 1 200 mOsm/kg. La mesure de l'osmolalité sanguine et urinaire permet de calculer la clairance osmolaire :

$$\text{Cosm (ml/min)} = \text{UOsm/Posm}$$

(2 ou 3 ml/min chez l'adulte sain en alimentation normale).

Cette valeur représente le volume d'urines émises en une minute nécessaire pour excréter les substances dissoutes à une concentration isotonique au plasma. Ce volume d'eau obligatoire, lié à une charge osmotique, définit la diurèse osmotique. La clairance de l'eau libre se définit comme la quantité d'eau théorique qu'il faut ajouter ou retrancher à l'urine pour que son osmolalité soit égale à celle du plasma.

$CH_2O$ (ml/min) = V – COsm (volume d'eau variable définissant la diurèse aqueuse)

Lorsque les urines sont concentrées ou hypertoniques (osmolalité urinaire supérieure à l'osmolalité plasmatique), la clairance de l'eau libre est négative (ce qui est en général le cas dans les conditions normales), de l'eau étant réabsorbée au niveau tubulaire. On définit $T_{CH_2O}$ (ml/min), qui représente la quantité d'eau libre réabsorbée au niveau tubulaire dans les cas de concentration urinaire.

$$T_{CH_2O} = V[(\text{Uosm/Posm}) - 1]$$

On peut écrire : $V = \text{Cosm} - T_{CH_2O}$

Au contraire, lorsque les urines sont diluées ou hypotoniques (osmolalité urinaire inférieure à l'osmolalité plasmatique), la clairance de l'eau libre est positive. On peut écrire : $V = \text{Cosm} + CH_2O$. Les fonctions de concentration-dilution sont explorées respectivement par des épreuves dynamiques de restriction hydrique et de charge hydrique.

**Restriction hydrique**

Elle doit entraîner une diminution de l'excrétion urinaire d'eau, donc une augmentation de la concentration osmotique des urines. Le sujet soumis à un régime riche en protéines observe un jeûne hydrique complet 12 heures avant l'épreuve. Sur les urines du matin, l'osmolalité doit être supérieure à 800 mOsm/L. On peut raccourcir cette épreuve par l'utilisation d'une perfusion de 4 à 6 U d'hormone antidiurétique synthétique. L'osmolalité doit s'élever à 800 mOsm/L dans les trois heures suivant la perfusion. L'épreuve de concentration s'impose dès qu'il existe une polyurie. Si la restriction hydrique entraîne une concentration normale des urines, il s'agit d'une polyurie par excès d'apport. Si le rein est incapable de concentrer les urines après l'épreuve, on a recours à l'administration d'hormone antidiurétique synthétique (dDAVP ou 1 déamino-8-D-arginine-vasopressine ou

Minirin®). L'augmentation de l'osmolalité urinaire témoigne d'une insuffisance de sécrétion d'ADH au niveau hypophysaire. Si l'osmolalité urinaire ne change pas, on conclut à un diabète insipide néphrogénique.

**Charge hydrique**

Cette épreuve teste la capacité à excréter une charge en eau. Le sujet absorbe 20 ml d'eau/kg en moins d'une heure. On recueille les urines toutes les heures pendant 5 heures. Normalement, l'osmolalité urinaire est inférieure à 100 mOsm/L avec un taux maximum d'excrétion d'eau libre de 12 à 18 ml/min/1,73 $m^2$.

### c) Fonction d'acidification

Une fonction d'acidification normale implique un nombre de néphrons fonctionnels suffisant, une réabsorption complète par le tube proximal et distal des bicarbonates filtrés, une capacité de sécrétion des ions $H^+$ normale et, enfin, une production d'ammoniac et une excrétion de phosphates en quantité suffisante.

■ ***PH urinaire***

Il est déterminé par la concentration des urines en ions $H^+$ libres (environ 1 %) et varie normalement de 4,6 à 7,8 en fonction de la production endogène des ions $H^+$.

■ ***Bicarbonates urinaires***

L'urine normale n'en contient pas, tous les ions bicarbonates étant réabsorbés jusqu'à un taux plasmatique de 27 mmol/L (seuil rénal des bicarbonates). Pour des concentrations plasmatiques supérieures, les bicarbonates filtrés en excès apparaissent dans les urines.

■ ***Acidité titrable***

Elle représente la quantité de meq de soude nécessaire pour ramener le pH urinaire à la valeur du pH plasmatique normal. Elle exprime la concentration d'équivalents acides. Elle dépend de la teneur de l'urine en tampon accepteur d'ions $H^+$ et du pH urinaire.

■ ***Ammoniurie***

Le dosage est effectué sur des urines de 24 heures recueillies sur toluène. L'excrétion rénale des ions $H^+$ sous forme $NH_4^+$ est favorisée par un pH acide (augmentation de la diffusion du $NH_3$) et une augmentation du débit urinaire. Normale chez l'adulte, elle est de l'ordre de 40 mmol/24 h.

■ ***Débit urinaire des ions $H^+$***

Il permet une approche précise du contrôle rénal de l'équilibre acido-basique. Il est égal à la somme des trois paramètres : acidité titrable (AT), ammoniurie et taux de bicarbonates (voir « *Physiologie rénale* »).

$$UV\ H^+ = AT + -$$

Normalement, l'excrétion des 70 à 80 meq d'ions $H^+$ produits chaque jour est assurée pour un tiers sous forme d'acidité titrable (AT) et pour deux tiers sous forme d'ammoniémie.

Le débit urinaire des ions $H^+$, UV $H^+$, varie en fonction de l'alimentation. Il augmente lors d'une alimentation riche en protéines et diminue dans les régimes végé-

tariens. L'exploration du contrôle rénal de l'équilibre acido-basique implique l'étude de la réponse rénale à des agressions acides ou alcalines. À cet égard, il existe un certain nombre d'épreuves dynamiques, la plus simple et la plus couramment pratiquée étant l'épreuve de charge acide *per os* : une charge de chlorure d'ammonium $NH4Cl$ (1 g/10 kg de poids) est administrée le matin. Les urines sont recueillies toutes les deux heures pendant huit heures. Des prélèvements sanguins à 0, 2 et 4 heures sont effectués pour la mesure du pH et des bicarbonates. Chez le sujet normal, la réponse est maximale entre deux et quatre heures après la charge. Le pH urinaire est inférieur à 5,2 (pH approprié), il y a augmentation de l'acidité titrable et de l'ammoniurie, diminution des bicarbonates et du pH plasmatiques (acidose transitoire). Un pH urinaire inapproprié et une excrétion d'ions $H^+$ insuffisante sont en faveur d'une acidose tubulaire distale.

## II. Syndrome d'insuffisance rénale chronique

### A. Définition

L'insuffisance rénale chronique (IRC) se définit comme une altération progressive des fonctions excrétrices, aboutissant à la rétention de produits de dégradation du métabolisme normalement éliminés dans l'urine, ainsi que par une atteinte des fonctions tubulaires et endocrines. Elle est la conséquence de lésions anatomiques progressives et irréversibles du parenchyme rénal au cours de maladies très diverses affectant les reins ou les voies excrétrices.

### B. Étiologie

La majorité des néphropathies chroniques, qu'elles soient acquises ou constitutionnelles, évoluent tôt ou tard vers l'IRC, qui progresse plus ou moins rapidement vers l'insuffisance rénale terminale. Les principales pathologies pouvant aboutir à une IRC sont les suivantes :
- néphropathies vasculaires (néphroangiosclérose et/ou sténose de l'artère rénale) souvent accompagnées d'une HTA sévère : 22,5 % ;
- néphropathies diabétiques : 20,6 % ;
- néphropathies glomérulaires : 20,3 % ;
- néphropathies interstitielles chroniques : 11,8 % ;
- néphropathies de reflux : 2,6 % ;
- néphropathies héréditaires : 8,8 % (polykystose rénale) ;
- maladies de système : 6,3 % ;
- causes indéterminées : 7,1 %.

Il faut retenir la forte progression des néphropathies vasculaires et diabétiques qui sont devenues ces dernières années en France les principales causes d'IRC, représentant 40 % des cas. Leur fréquence est en augmentation. La part des néphropathies héréditaires est prédominante chez l'enfant et l'adolescent, les néphropathies glomérulaires plus importantes chez l'adulte jeune, les néphropathies interstitielles et vasculaires nettement prédominantes chez l'adulte âgé et le vieillard.

## C. Diagnostic de l'IRC

### 1. Sémiologie clinique

Elle est souvent discrète et longtemps latente, et son diagnostic est essentiellement biologique. L'IRC est facilement dépistée par des examens biologiques systématiques chez des patients porteurs d'une néphropathie connue et suivie. Elle peut être révélée devant l'apparition de certains symptômes cliniques tels qu'œdèmes, hypertension artérielle ou encore lors de la présence d'anomalies biologiques constatées à l'occasion d'un examen biologique systématique (protéinurie, hématurie…) justifiant alors une exploration approfondie de la fonction rénale. L'IRC doit être systématiquement recherchée au décours d'une insuffisance rénale aiguë, lors de la surveillance d'une néphropathie, à l'occasion de la découverte d'une néphropathie.

Quel que soit le DFG, la persistance pendant plus de trois mois de marqueurs biologiques d'atteinte rénale (protéinurie, leucocyturie, hématurie, microalbuminurie chez le diabétique de type 1) et/ou anomalies morphologiques, témoigne d'une maladie rénale qui impose un diagnostic étiologique et/ou une surveillance néphrologique. Un DFG < 60 ml/min/1,73 $m^2$ est une insuffisance rénale indiscutable, avec ou sans marqueurs d'atteinte rénale associés.

### 2. Diagnostic biologique

#### a) Rétention azotée

La baisse de la filtration glomérulaire étant globalement proportionnelle à la réduction néphronique, on considère que l'étude des substances éliminées essentiellement par filtration glomérulaire reflète le degré de l'insuffisance rénale.

■ *Créatinine*

L'élévation de la créatininémie est le meilleur reflet en clinique courante de la baisse de la filtration glomérulaire. La créatininémie est indépendante du volume de la diurèse et du régime alimentaire. Sa production dépend de la masse musculaire et est donc relativement constante d'un jour à l'autre pour un individu donné. Comme cela a déjà été souligné, la créatininémie est un marqueur imparfait du DFG mais reste facile de réalisation. Elle conserve cependant une valeur d'alerte. En effet, 85 % des adultes ayant un DFG < 60 ml/min/1,73 $m^2$ ont une créatininémie > 137 µmol/L chez l'homme et > 104 µmol/L chez la femme. La mesure de la clairance de la créatinine, malgré ses limites, reste un examen couramment pratiqué pour déterminer le degré de l'IRC :

- IRC modérée pour une clairance de la créatinine comprise entre 30 et 60 ml/min/1,73 $m^2$, le plus souvent sans incidence clinique ;
- IRC rénale sévère lorsque les valeurs sont comprises entre 15 et 30 ml/min/1,73 $m^2$. En absence d'anémie, de signes cardio-vasculaires ou de syndrome néphrotique, l'état clinique peut être normal ;
- IRC terminale lorsque la clairance de la créatinine s'abaisse au-dessous de 15 ml/min/1,73 $m^2$. À ce stade, apparaissent la plupart des désordres biologiques ainsi que des manifestations extrarénales.

Lorsque la clairance est inférieure à 5 ml/min, aucune adaptation efficace du rein n'est possible pour assurer l'homéostasie hydrosodée, et la suppléance des reins malades ne pourra être assurée que par l'hémodialyse ou la transplantation rénale.

#### ■ *Urée sanguine*

Le taux d'urée sanguine n'est pas un aussi bon reflet de la valeur de la filtration glomérulaire que celui de la créatinine puisque nous avons vu que son taux est également influencé par le régime alimentaire en protéines et l'importance du catabolisme azoté. La rétention d'urée est accrue par une alimentation riche en protéines et par l'hypercatabolisme protidique. Elle est également influencée par le débit urinaire. Si une élévation de l'urémie traduit le plus souvent une insuffisance rénale, la seule détermination de l'urée ne permet pas d'affirmer le degré d'insuffisance rénale.

#### ■ *Acide urique*

En général, la concentration plasmatique d'acide urique reste normale tant que le débit de filtration est supérieur à 20 ml/min, grâce à une augmentation de la sécrétion tubulaire d'acide urique. L'hyperuricémie est de règle dans l'IRC avancée ou en présence de facteurs favorisant la réabsorption tubulaire (diurétiques, hypovolémie) ou en cas d'hyperproduction expliquant la possibilité de crise de goutte. Elle est généralement bien tolérée et le plus souvent asymptomatique. Elle n'est traitée qu'en cas de survenue de symptômes par l'allopurinol (Zyloric®) ou la rasburicase (Fasturtec®).

### b) Désordres électrolytiques

Jusqu'à un stade avancé de l'IRC, en pratique jusqu'à des débits de filtration de l'ordre de 20 à 25 ml/min, le rein est capable d'éliminer la même quantité de substances dissoutes grâce à une adaptation des néphrons sains restants. Pour des valeurs inférieures à 20 ml/min, l'équilibre ne peut plus être assuré et apparaissent des troubles de l'élimination hydrosodée se manifestant essentiellement par une hyperhydratation avec hyponatrémie.

#### ■ *Diurèse*

La diurèse de 24 heures est le plus souvent normale jusqu'au stade terminal de l'IRC. Une polyurie de type osmotique peut cependant être observée, liée à la diminution du nombre de néphrons fonctionnels. Lorsque la filtration s'abaisse en dessous de 15 ml/min, il y a perte du pouvoir de dilution, la clairance de l'eau libre est abaissée et le risque d'hyperhydratation avec hyponatrémie est important. Ces troubles guérissent par simple restriction hydrique.

#### ■ *Natrémie*

C'est en diminuant la réabsorption tubulaire du sodium que les néphrons restants maintiennent l'homéostasie du sodium jusqu'à un stade avancé de l'IRC. La restriction sodée ne se fera qu'en fonction de l'existence d'une hypertension artérielle. Les œdèmes parfois présents peuvent être la conséquence d'un syndrome néphrotique ou d'une insuffisance cardiaque associée et ne sont pas un symptôme obligatoire de l'IRC.

## 2. Traitement symptomatique

### a) Hypertension artérielle

Elle doit être absolument corrigée pour retarder la progression de l'insuffisance rénale vers le stade terminal. Bêtabloquants, inhibiteurs de l'enzyme de conversion, antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II, diurétiques (Lasilix®).

### b) Désordres phosphocalciques

L'ostéodystrophie rénale doit être prévenue et traitée par :
- un apport calcique sous forme de carbonate de calcium ;
- une restriction phosphatée par des agents complexant le phosphore ou l'hydroxyde d'aluminium.

### c) Anémie

Correction par administration d'érythropoïétine recombinante (Eprex®), les transfusions n'étant utilisées qu'en cas d'urgence.

## 3. Traitement de la suppléance

Lorsque la clairance de la créatinine s'abaisse au-dessous de 5 ml/min, aucune adaptation efficace du rein n'est possible pour assurer l'homéostasie hydrosodée. Celle-ci ne pourra être maintenue que par un traitement de suppléance.

### a) Hémodialyse extracorporelle

Ce traitement réalise une ultrafiltration du sang qui entre en contact par l'intermédiaire d'une membrane artificielle semi-perméable avec un liquide de dialyse dont la composition ionique est celle d'un plasma normal. La composition électrolytique et la température du dialysat sont contrôlées en permanence. En ce qui concerne la fonction d'excrétion des déchets, l'hémodialyse réalise globalement une situation analogue à celle d'un malade ayant une filtration glomérulaire de 20 ml/min.

### b) Dialyse péritonéale

C'est la membrane péritonéale, richement vascularisée, qui fait office de membrane de dialyse, séparant d'un côté le sang à épurer et de l'autre le dialysat injecté dans la cavité abdominale. Le renouvellement du dialysat doit être opéré régulièrement. On distingue la dialyse péritonéale continue ambulatoire (DPCA), forme manuelle de la dialyse, et la dialyse péritonéale automatisée (DPA), s'opérant la nuit à l'aide d'une machine.

### c) Transplantation rénale

C'est le traitement de choix pour les enfants et les adultes jeunes. Elle se fait soit à partir d'un donneur vivant volontaire, histocompatible (compatibilité ABO, identité HLA et culture mixte lymphocytaire non stimulée entre donneur et receveur), soit à partir d'un rein de coma dépassé choisi sur la base de la compatibilité ABO et du maximum d'identité dans le système HLA. Le suivi d'un patient transplanté est dominé par quatre problèmes majeurs étroitement intriqués : infection, rejet, toxicité médicamenteuse et néoplasies (risque de cancer multiplié par trois).

# III. Insuffisance rénale aiguë

## A. Définition

L'insuffisance rénale aiguë (IRA) est définie par la perte habituellement brutale (quelques heures ou jours) de tout ou partie des fonctions rénales antérieurement stables. L'IRA provoque un syndrome d'urémie aiguë quelle que soit sa cause ou son mécanisme, caractérisée par l'apparition de complications résultant de l'incapacité des reins à assurer l'homéostasie hydro-électrolytique et à éliminer les déchets organiques. L'atteinte rénale est en général réversible, spontanément ou sous l'influence d'un traitement étiologique.

## B. Étiologie

Les causes, les mécanismes et les lésions rénales des IRA sont multiples.

### 1. IRA prérénale ou fonctionnelle

C'est la plus fréquente. C'est celle qui est immédiatement réversible et qu'il faut dépister en premier, la fonction tubulaire est en partie respectée. Le rein reste sain mais n'assure plus ses fonctions excrétrices, essentiellement du fait d'un défaut de perfusion. Les causes des IRA fonctionnelles sont résumées dans le *tableau* 2.

**Tableau 2.** Causes des insuffisances rénales aiguës fonctionnelles

| |
|---|
| **I. Hypovolémie par deshydratation extracellulaire** |
| A. Par pertes extrarénales de sodium (natriurèse < 20 mmol/L)<br>1. Digestives : vomissements, occlusions, diarrhées, fistules<br>2. Cutanées : brûlures étendues, eczémas aigus, mucoviscidose<br>3. Création d'un 3e secteur : occlusion, pancréatite, péritonite |
| B. Par perte rénale (natriurèse > 40 mmol/L)<br>Insuffisance minéralocorticoïde<br>Diurétique avec alcalose et hypokaliémie<br>Diurèse osmotique : diabète sucré, mannitol<br>Néphropathie antérieure avec majoration de l'IR préexistante |
| **II. États de choc** |
| Hémorragies<br>Infections (septicémie)<br>Cardiaques (infarctus, trouble du rythme) |
| **III. Troubles de l'hémodynamique intrarénale** |
| Inhibiteurs de l'enzyme de conversion<br>Anti-inflammatoires non stéroïdiens |
| **IV. Hypoalbuminémies** |
| Syndrome néphrotique<br>Cirrhose hépatique |

### 2. IRA parenchymateuse ou organique

L'altération d'un ou plusieurs éléments constitutifs du rein est responsable de l'insuffisance rénale. Elles sont de deux types :

- dues à des maladies rénales : néphropathies interstitielles aiguës infectieuses (septicémie, infections urinaires ascendantes) ou immunoallergiques médicamenteuses (pénicillines, céphalosporines…), certaines néphropathies glomérulo-vasculaires. Elles sont de réversibilité aléatoire ;
- dues à une agression extrarénale : elles ont souvent comme cause un état de choc quelle qu'en soit l'étiologie, un traumatisme (rhabdomyolyse), un acte chirurgical ou un agent néphrotoxique, une hémolyse intravasculaire. Ce type d'IRA est classé sous la rubrique de nécrose tubulaire aiguë. Elle est la plus fréquente et est spontanément réversible.

### 3. IRA postrénale ou obstructive

Elle comprend tous les obstacles sur les voies excrétrices (lithiases, cancers, adénome prostatique…). L'évolution est en général favorable après la levée de l'obstacle.

## C. Diagnostic

Il est essentiellement biologique. L'examen radiologique (tomographie, échographie) est la première étape diagnostique et permet en général de différencier IRC et IRA. Dans l'IRA, les reins sont symétriques, de taille normale ou plus souvent augmentée. Dans l'IRC, les mêmes méthodes d'investigation montrent une atrophie rénale, en général asymétrique. Bien que les circonstances de découverte soient multiples, le diagnostic positif de l'IRA repose sur l'élévation simultanée de la créatininémie et de l'urémie. Le syndrome biologique observé au cours d'une IRA est le suivant :

### 1. Rétention azotée

#### a) Urée sanguine

Son élévation est constante au cours de l'IRA. Son dosage est un bon moyen d'évaluer l'intensité du catabolisme protidique puisque celui-ci est fonction des lésions associées ou des complications des IRA : lésions musculaires traumatiques, infectieuses, toxiques, atteinte viscérale, septicémie… Une augmentation de l'urémie de 8 mmol/24 h évoque à coup sûr une lésion associée ou une complication qu'il faut identifier et traiter. D'autre part, une urémie de 35 à 40 mmol/L est une indication d'épuration extrarénale.

#### b) Créatinine

Elle augmente au cours de l'IRA. Chez un sujet totalement anurique, elle peut augmenter de 200 µmol/L par 24 heures.

#### c) Acide urique

En général, l'uricémie est supérieure à 400 µmol/L car son élimination est en grande partie rénale. Certaines hyperuricémies précèdent l'IRA et en sont la cause.

**Tableau 3.** Différence de composition urinaire lors d'une IRA fonctionnelle ou d'une IRA organique

| Composition urinaire | IRA fonctionnelle | IRA organique |
|---|---|---|
| Sodium (mmol/L) | < 20 | > 60 |
| Na+/K+ | < 1 | > 1 |
| Urée urinaire/urée sanguine | > 10 | < 10 |
| Osmolalité urinaire/osmolalité sanguine | > 2 | < 1 |
| Osmolalité urinaire | > 500 | < 350 |

## D. Évolution et traitement

L'évolution est en général favorable et l'atteinte rénale réversible après un traitement adapté à chaque type d'IRA.

### 1. Traitement conservateur

Il vise à supprimer les troubles humoraux menaçant le pronostic vital :
- l'hyperkaliémie : administration de gluconate de Ca, perfusion de soluté glucosé contenant de l'insuline, résine échangeuse d'ions, etc. ;
- l'acidose métabolique ne sera compensée que si elle est sévère (pH < 7,20).

L'hémodialyse est une indication d'extrême urgence lorsque la kaliémie dépasse les 6,5 mmol/L, les bicarbonates sont inférieurs à 15 mmol/L ou lorsque l'acidose est en voie de décompensation.

### 2. Traitement spécifique

- *IRA fonctionnelle :* le rétablissement de la volémie par transfusion de sang ou de plasma, ou la perfusion de soluté salé entraînent généralement une reprise de la diurèse dans les 4 à 6 heures.
- *IRA obstructive* après levée de l'obstacle, le retour à la fonction rénale normale s'effectue plus ou moins rapidement suivant la sévérité et la durée de l'obstacle.
- *IRA parenchymateuse* : le traitement est variable suivant l'affection causale – suppression du toxique, traitement de l'infection…

Certaines affections entraînent des lésions rénales irréversibles pouvant évoluer vers l'IRC. Les néphropathies glomérulaires sont des affections du parenchyme rénal dans lesquelles les lésions initiales touchent prioritairement les glomérules. Elles constituent la cause la plus fréquente d'IRC avant 60 ans. Elles peuvent être primitives ou secondaires à une affection générale. Elles peuvent être aiguës ou chroniques. Le syndrome de néphropathie glomérulaire est constitué d'une ou plusieurs des anomalies suivantes : protéinurie abondante, hématurie micro- ou macroscopique accompagnée ou non de cylindres hématiques, œdèmes, hypertension artérielle, insuffisance rénale. Le regroupement de ces signes et/ou de leur allure évolutive permet de définir à l'intérieur même du syndrome de néphropathie glomérulaire plusieurs syndromes dont la valeur séméiologique est précise. Parmi ces syndromes, le syndrome néphrotique et le syndrome néphritique aigu.

# IV. Syndrome néphrotique

## A. Définition

Elle est purement biologique et repose sur l'association :
- d'une protéinurie massive (supérieure à 3 g/24 h) et durable ;
- d'une hypoprotidémie (< 60 g/L) essentiellement due à une diminution de l'albumine à un taux inférieur à 30 g/L.

Ces anomalies sont souvent accompagnées d'œdèmes et d'une hyperlipidémie avec hypercholestérolémie. La symptomatologie clinique est dominée par un syndrome œdémateux. On distingue schématiquement :
- le SN pur caractérisé par l'absence d'hématurie microscopique, d'hypertension artérielle ou d'IRC. Le rein est optiquement normal. Ce type de SN est plus fréquemment rencontré chez le jeune enfant que chez l'adulte (désigné encore sous le terme de « néphrose lipoïdique ») ;
- le SN impur : hématurie, hypertension artérielle ou IR persistante sont associées aux éléments du syndrome néphrotique. Les lésions glomérulaires sont alors plus sévères. Il se rencontre aussi bien chez l'enfant que chez l'adulte.

Les principales étiologies sont résumées dans le *tableau 4*.

**Tableau 4.** Principales néphropathies glomérulaires accompagnées d'un tableau de syndrome néphrotique

| | |
|---|---|
| Primitives | Glomérulonéphrites à lésions glomérulaires minimes<br>Glomérulonéphrite extramembraneuse idiopathique<br>Glomérulonéphrite membrano-proliférative |
| Secondaires | Amylose rénale<br>Glomérulonéphrite extramembraneuse lupique<br>Polyarthrite rhumatoïde |

## B. Diagnostic clinique

Il correspond en général à l'apparition d'œdèmes non douloureux et non inflammatoires, généralisés massifs chez l'enfant et souvent plus discrets chez l'adulte. Ils apparaissent suivant des modalités variables. Dans certains cas, l'apparition est insidieuse et c'est une prise de poids inexpliquée qui les fait découvrir. Dans d'autres, l'apparition est brutale. Les œdèmes sont blancs, mous et indolores. Il peut arriver qu'une protéinurie abondante, découverte à l'occasion d'un examen systématique soit révélatrice d'un syndrome néphrotique avant l'apparition des œdèmes.

## C. Diagnostic biologique

### 1. Signes urinaires

L'oligurie est fréquente au début. La protéinurie est permanente, massive, toujours supérieure à 3 g/24 h. Elle est presque toujours sélective, constituée essentielle-

ment d'albumine qui forme environ 80 % des protéines urinaires, les molécules plus grosses comme les IgG étant retenues par la membrane glomérulaire. Au niveau des électrolytes, la natriurèse est basse, souvent inférieure à 10 meq/24 h avec une kaliurèse élevée en raison d'un hyperaldostéronisme secondaire. Le rapport Na/K est inférieur à 1.

## 2. Au niveau sanguin

### a) Protides

La protidémie est toujours inférieure à 60 g/L et peut descendre jusqu'à des valeurs inférieures à 40 g/L. L'électrophorèse des protéines sériques a un profil particulier (*fig.* 2). L'albumine est effondrée en pourcentage et en valeur absolue : elle est presque toujours inférieure à 20 g/L. Cette hypoalbuminémie traduit essentiellement la fuite urinaire de l'albumine mais aussi une augmentation du catabolisme insuffisamment compensée par l'augmentation de la synthèse hépatique. La diminution des γ-globulines est généralement moins marquée et correspond d'une part à une augmentation du catabolisme rénal, d'autre part à une diminution de la production par les plasmocytes. Les α2-globulines sont toujours augmentées (supérieures à 12 %), les β-globulines fréquemment diminuées.

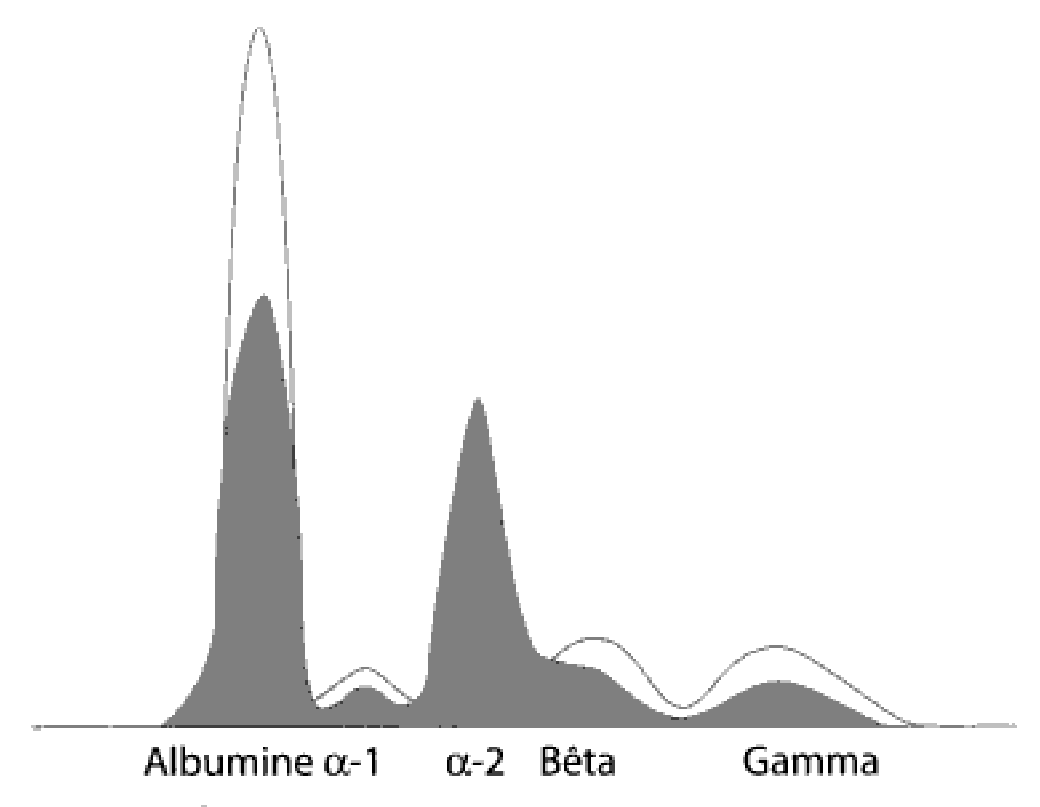



**Figure 2.** Électrophorèse de protéines dans un syndrome néphrotique

### b) Lipides

On observe fréquemment dans le SN une hyperlipidémie portant sur le cholestérol et les triglycérides (sérum lactescent). Le mécanisme n'est pas parfaitement connu. Il existe une bonne corrélation entre l'hyperlipidémie et l'hypoalbuminémie. Ces

perturbations pourraient être dues à une augmentation de la synthèse hépatique des lipoprotéines allant de pair avec celle de l'albumine.

**c) Autres paramètres sanguins**

- *La natrémie* est normale ou diminuée en cas d'hyperhydratation intracellulaire.
- *La calcémie* est en général diminuée : cette baisse porte essentiellement sur la fraction liée aux protéines.
- *Troubles de la coagulation :* il existe un état d'hypercoagubilité lié à une augmentation des facteurs de la coagulation et à une hyperplaquettose. La vitesse de sédimentation est augmentée de façon importante indépendamment de tout syndrome inflammatoire.

### D. Évolution et traitement

L'évolution peut être émaillée d'un certain nombre de complications liées à la présence du syndrome néphrotique quelle qu'en soit la cause :
- des complications infectieuses : elles sont nombreuses et favorisées par la baisse des immunoglobulines et les traitements proposés ;
- des crises douloureuses abdominales dues à des foyers œdémateux ;
- des complications thrombo-emboliques favorisées par l'hypercoagubilité.

Le traitement symptomatique des syndromes néphrotiques comporte en général la prescription de diurétiques (diurétiques de l'anse type Furosémide®) associée à un régime sans sel. Chez l'enfant, il est habituel de prescrire une corticothérapie (prednisone). Le syndrome néphrotique pur de l'enfant est presque toujours corticosensible et la rémission est souvent très rapide : diminution de l'albuminurie, augmentation de la natriurèse, disparition des œdèmes. Certaines formes sont corticorésistantes et peuvent être l'indication d'un traitement immunosuppresseur.

## V. Syndrome néphritique aigu

### A. Définition

Les néphropathies glomérulaires aiguës ont en commun un syndrome clinique : le syndrome néphritique aigu. Les principales néphropathies pouvant se révéler par un syndrome néphritique aigu sont les glomérulonéphrites aiguës, les glomérulonéphrites chroniques isolées (GN à dépôts d'IgA, GN membranoprolifératives) ou néphropathies secondaires à une maladie générale type lupus ou purpura rhumatoïde. Ce syndrome est défini par l'apparition brutale en quelques jours ou semaines d'une protéinurie, d'une hématurie souvent macroscopique, d'un œdème périphérique, d'une hypertension artérielle et d'une insuffisance rénale d'intensité variable. Il est la conséquence d'une inflammation aiguë du flocculus glomérulaire secondaire à diverses atteintes histologiques rénales.

## B. Données biologiques

### 1. Protéinurie

Elle est d'abondance variable comprise entre 1 et 3 g/24 h. Elle est en général non sélective.

### 2. Signes urinaires

Les urines sont rares (oligurie) et de couleur franchement anormale, soit de type « bouillon sale », soit franchement hématiques. L'étude du sédiment urinaire montre des hématies nombreuses et altérées. L'hématurie est l'élément le plus constant du syndrome néphritique. Elle est le plus souvent microscopique. La présence de cylindres hématiques est pratiquement constante. Les urines sont concentrées et le sodium urinaire est bas bien qu'il existe des œdèmes, ce qui témoigne de l'intégrité du système tubulaire. La concentration d'urée urinaire est élevée.

### 3. Fonction rénale

L'insuffisance rénale est habituelle mais modérée (créatininémie : 120 à 250 µmol/L). Elle est exceptionnellement anurique. L'urée sanguine s'élève progressivement, parallèlement à la créatinine.

### 4. Autres examens

- Le complément total et son composant C3 sont habituellement effondrés.
- La présence d'une cryoglobuline et/ou d'immuns complexes circulants est fréquente.

## C. Étiologies

Le syndrome néphritique aigu est la conséquence d'une hypercellularité endocapillaire aiguë : celle-ci met en jeu des cellules glomérulaires ou des cellules étrangères (macrophages, polynucléaires). Ces anomalies histologiques ont des conséquences multiples :

- lésions de la membrane basale glomérulaire, responsables de la protéinurie et de l'hématurie ;
- réduction de la filtration glomérulaire.

La rétention hydrosodée entraîne une surcharge volémique qui intéresse à la fois le secteur vasculaire (hypertension artérielle) et le secteur interstitiel (œdèmes).

De nombreuses pathologies glomérulaires sont responsables d'un syndrome néphritique. Elles peuvent être primitives ou secondaires. Elles présentent le tableau biologique commun au syndrome néphritique aigu et seule la ponction biopsie rénale est indispensable pour affirmer le diagnostic et classer le type de glomérulopathie.

## L'essentiel de la question

Motivée par des troubles fonctionnels, une altération de l'état général, la présence d'un symptôme précis ou encore une anomalie lors d'un dépistage systématique, une exploration fonctionnelle rénale doit être conduite dans un ordre logique. Une évaluation de première intention, mettant en œuvre des examens d'usage courant hiérarchisés du plus simple au plus complexe, confrontée à une exploration radiologique (échographie, urographie intraveineuse) suffit généralement à établir un diagnostic. Mais, dans certains cas particuliers, l'exploration peut faire appel à des épreuves dynamiques biochimiques et/ou isotopiques, des examens immuno-histologiques d'interprétation plus délicate et nécessitant une structure spécialisée.
Le *tableau* suivant regroupe les principaux examens utilisés lors d'une exploration fonctionnelle rénale. Le rein intervenant dans de nombreuses régulations, cette liste n'est évidemment pas exhaustive, et un bilan plus complet nécessitant d'autres examens complémentaires pourra s'avérer nécessaire.

| | Examens de 1[re] intention | Examens spécialisés |
|---|---|---|
| **Dosages sanguins** | Créatinine, urée, ionogramme | |
| **Dosages urinaires** | Protéinurie, créatinine, urée, ionogramme | |
| **Estimation DFG** | Clairance créatinine mesurée<br>Clairance Cockroft et Gault | Clairance inuline<br>Dosage cystatine C |
| **Exploration tubulaire**<br>– Élimination de l'eau | Diurèse<br>Osmolalité | Épreuve de concentration<br>Clairance osmolaire<br>Clairance de l'eau libre<br>Débit des ions<br>Épreuve d'acidification<br>TmG |
| – Élimination des ions $H^+$ | pH | |
| – Réabsorption du glucose | Glycosurie | |

L'insuffisance rénale chronique, dont la prévalence est difficile à connaître en raison de son extrême latence, est une maladie dans laquelle l'atteinte rénale est irréversible. Elle évolue inexorablement vers la perte totale des fonctions rénales, d'où l'importance d'en évaluer le retentissement viscéral (cardio-vasculaire, osseux et hématologique). Au stade terminal, seul un traitement de suppléance pourra pallier la perte des fonctions rénales (dialyse ou transplantation). Il est donc important derechercher et de traiter les facteurs d'aggravation pour essayer d'enrayer la progression vers le stade ultime. Les étiologies de l'insuffisance rénale aiguë sont multiples et contrairement à l'IRC, l'atteinte rénale est en général réversible. Après avoir affirmé le caractère aigu et trouvé la cause de cette IRA, un traitement spécifique adapté à chaque type d'IRA sera envisagé. La définition du syndrome néphrotique est purement biologique et le diagnostic est le plus souvent évident. La symptomatologie clinique est dominée par le syndrome œdémateux et il est important de pré ciser le caractère pur ou impur d'un syndrome néphrotique afin de poser au mieux

les indications thérapeutiques. Enfin, le syndrome néphritique consiste en l'apparition brutale et à peu près simultanée de tous les éléments du syndrome néphrotique (protéinurie abondante, apparition d'œdèmes, hypertension artérielle). Il est souvent secondaire à une glomérulonéphrite aiguë poststreptococcique ou un autre type de néphropathie glomérulaire aiguë primitive ou secondaire.

***Pour en savoir plus***


- Paillard F. Explorations fonctionnelles rénales. *Néphrologie* G. Richet, 1988 : 23-42.
- Trolliet P. Explorations fonctionnelles tubulaires. *Revue française des laboratoires*. 1994, 268 : 72-7.
- Schmitt F. Exploration fonctionnelle rénale. Cahier de formation continue Biochimie Tome III, 1996 : 121-36.
- Jungers P. *Insuffisance rénale chronique : prévention et traitement*. Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 1998.
- *Diagnostic de l'insuffisance rénale chronique chez l'adulte : recommandations pour la pratique clinique*. HAS, Haute Autorité de santé, 2002.

# Sémiologie biologique hépatique : cholestase, insuffisance hépato-cellulaire, cytolyse et inflammation hépatique

Ph. PODEVIN, Hôpital Cochin, AP-HP, Paris.

*L'analyse de la biologie hépatique permet d'individualiser quatre grands syndromes biologiques : le syndrome de cholestase, le syndrome d'insuffisance hépatocellulaire, le syndrome de cytolyse et le syndrome d'inflammation hépatique.*
*Au cours des maladies du foie, ces différents syndromes sont très souvent associés et quasiment toujours présents au stade terminal de la maladie hépatique. À des stades plus précoces, l'analyse sémiologique de ces différents signes de syndromes permet :*
- *dans un contexte clinique, d'orienter un diagnostique étiologique (prédominance de l'un ou l'autre des quatre syndromes) ;*
- *de suivre l'évolution des processus lésionnels ;*
- *d'évaluer l'effet d'un traitement : antiviral (diminution de la cytolyse), anticholestatique, anti-inflammatoire, ou de l'insuffisance hépatocellulaire.*

# I. Syndrome de cholestase

## A. Définition

Le syndrome de cholestase correspond à l'ensemble des perturbations engendrées par une diminution ou une interruption de la sécrétion biliaire. Les deux conséquences principales sont, d'une part, une accumulation dans le foie et les tissus de l'ensemble des substances normalement éliminées dans la bile et, d'autre part, une diminution ou une absence d'acides biliaires dans la lumière digestive. En fonction de la nature du mécanisme lésionnel, on définit la cholestase intrahépatique correspondant à une atteinte hépatocytaire et/ou des petits canaux biliaires, et la cholestase extrahépatique, correspondant à une atteinte des grosses voies biliaires extrahépatiques.

## B. Caractéristiques biochimiques

### 1. Augmentation des acides biliaires plasmatiques

L'augmentation de la concentration plasmatique des acides biliaires est un signe nécessaire et suffisant pour porter le diagnostic de cholestase. Compte tenu du caractère dynamique du cycle entérohépatique (six à huit recirculations quotidiennes), l'augmentation de la concentration plasmatique des acides biliaires est un signe précoce et sensible. Cette augmentation concerne essentiellement les acides biliaires primaires (acide cholique et acide chénodésoxycholique) directement synthétisées par l'hépatocyte. En raison de l'absence d'acides biliaires dans la lumière digestive, le taux plasmatique d'acide désoxycholique issu du métabolisme intestinal de l'acide cholique diminue.
En pratique clinique, la concentration plasmatique des acides biliaires totaux est déterminée par un test colorimétrique. Ce test peut être sensibilisé en répétant la mesure en période postprandiale (effet stimulant du bol alimentaire sur la contraction vésiculaire). On peut également disposer d'un dosage par chromatographie, permettant d'estimer la proportion relative des différents acides biliaires. L'accumulation d'acides biliaires dans les tissus est responsable de prurit présent au cours des maladies cholestatiques.

néanmoins être importante en cas de cholestase d'installation brutale (migration lithiasique).

## C. Anomalies des tests de coagulation

Le foie synthétise différents facteurs de coagulation (I, II, V, VII, IX, X.) Cette synthèse est dépendante de la présence de vitamine K pour les facteurs (II, VII, IX, X). En cas de cholestase prolongée, une carence en vitamine K s'installe, conséquence de la malabsorption des vitamines liposolubles. Le diagnostic doit être posé devant un allongement du taux de prothrombine qui mesure globalement les facteurs II, V, VII, X, et un taux normal de facteur V. Le diagnostic est confirmé par la normalisation du TP après injection de vitamine K (test de Koller).

## D. Anomalies des globulines plasmatiques

Le taux de gammaglobulines sérique est augmenté en cas de cholestase prolongée. Une élévation des immunoglobulines M est très évocatrice de cirrhose biliaire primitive.

## E. Autres signes

### 1. Hypercholestérolémie

Compte tenu du rôle fondamental de la sécrétion biliaire dans l'homéostasie du cholestérol (élimination quotidienne de 2 g de cholestérol), la cholestase induit une augmentation du cholestérol total et des phospholipides normalement excrétés dans la bile. Il existe également une élévation modérée des triglycérides.

### 2. Stéatorrhée

La stéatorrhée définie par une augmentation de la concentration fécale en lipides peut être observée en raison d'un défaut d'absorption intestinale d'acides gras. La carence luminale en acides biliaires entraîne un défaut d'émulsion des graisses et, par voie de conséquence, une hydrolyse incomplète par la lipase pancréatique. Les acides gras non absorbés se retrouvent alors en excès dans les fèces. En cas de cholestase prolongée, il existe pour les mêmes raisons un défaut d'absorption des vitamines liposolubles (A, D, E, K).

# II. Syndrome d'insuffisance hépatocellulaire

## A. Définition

Le terme « insuffisance hépatocellulaire » désigne l'ensemble des manifestations en rapport avec une diminution ou un arrêt des fonctions hépatocytaires. Il en

# Anomalies qualitatives et quantitatives des protéines plasmatiques

D. BIOU, Laboratoire de biochimie, Hôpital Robert Debré, AP-HP, Paris.

**I. Physiologie des protéines plasmatiques**

- **A.** Synthèse
- **B.** Catabolisme
- **C.** Distribution
- **D.** Fonctions physiologiques et biologiques majeures

**II. Protéinémie, ou protéines totales ou protidémie**

- **A.** Valeurs usuelles et variations physiologiques
- **B.** Variations pathologiques
- **C.** Incidences de la protéinémie sur d'autres paramètres plasmatiques

**III. Protéinogramme, ou électrophorèse des protéines sériques ou protidogramme**

- **A.** Profil normal
- **B.** Variations physiologiques
- **C.** Variations pathologiques

**IV. Principaux marqueurs protéiques**

- **A.** Marqueurs de la réponse inflammatoire aiguë
- **B.** Marqueurs de l'immunité humorale
- **C.** Marqueurs de l'état nutritionnel
- **D.** Marqueurs du statut martial
- **E.** Alpha-1-antitrypsine ($\alpha$1-AT)
- **F.** Céruloplasmine ou céruléoplasmine (Cp)
- **G.** Bêta-2-microglobuline ($\beta$2-M)
- **H.** Alpha-1-microglobuline ($\alpha$1-M)
- **I.** Quelques exemples de profils protéiques ciblés

*L'intitulé de cette question présente l'ambiguïté majeure de ne pas définir les protéines d'intérêt sémiologique à traiter. En effet, le plasma sanguin et le liquide interstitiel contiennent des centaines de protéines et peptides aux fonctions biologiques plus ou moins clairement établies.*
*Certaines catégories de protéines relevant d'autres questions ont été exclues : les enzymes, les hormones, les facteurs de coagulation, les marqueurs tumoraux, les lipoprotéines. Finalement ont été retenues les protéines considérées comme les meilleurs marqueurs sémiologiques pour explorer quelques grands syndromes ou pathologies comme la réponse inflammatoire (protéine C-réactive, orosomucoïde, haptoglobine), la fonction immunitaire (immunoglobulines G, A, M), l'hémolyse (haptoglobine), la dénutrition (préalbumine, albumine), la carence martiale (transferrine, ferritine), certaines pathologies héréditaires (α1-antitrypsine, céruloplasmine) ou malignes (immunoglobulines G, A, M, β2-microglobuline) et enfin les fonctions glomérulaire et tubulaire (albumine, immunoglobuline G, α1-microglobuline urinaires).*
*Dans un ordre logique seront successivement présentés les intérêts sémiologiques, d'une part, de l'analyse des protéines totales au plan quantitatif (protéinémie) et au plan qualitatif (protéinogramme) et, d'autre part, du dosage spécifique de chaque protéine, exprimé pondéralement, ou sous forme de profil protéique.*

# I. Physiologie des protéines plasmatiques

La concentration plasmatique d'une protéine dépend de la synthèse, du catabolisme et de la distribution (ou perte) dans d'autres liquides (interstitiel, ascite, pleural, urine, selles).

## A. Synthèse

La plupart des protéines plasmatiques après modifications post-traductionnelles sont glycosylées (N- et/ou O-glycosylée) par des chaînes glycannes de structure et charge variables. Il en résulte une micro-hétérogénéité portant sur la structure, la masse et la charge à l'origine de propriétés biologiques (demi-vie) et physicochimiques particulières (bandes diffuses ou multiples en PAGE-SDS – *polyacrylamid gel electrophoresis sodium dodecyl sulfate* – ou en IEF – isoélectrofocalisation).
L'hépatocyte constitue le lieu principal de synthèse des protéines plasmatiques (d'où leur diminution dans les syndromes d'insuffisance hépatocellulaire), à l'exception des immunoglobulines (Ig) synthétisées par les plasmocytes.
Une anomalie génétique peut se traduire par :
- une absence de synthèse (déficit en IgA) ;
- une synthèse d'une protéine anormale non sécrétée par la cellule (déficit en α1-antitrypsine : α1-AT) ou sécrétée mais fonctionnellement ou structurellement déficiente (inhibiteur du C1-estérase dans l'œdème angioneurotique héréditaire, céruloplasmine dans la maladie de Wilson).

## B. Catabolisme

Le catabolisme des protéines plasmatiques a lieu dans toutes les cellules mais plus particulièrement dans le foie, le rein et les cellules endothéliales des capillaires. La désialylation des glycoprotéines par des neuraminidases membranaires ou circulantes favorise leur élimination par le foie après fixation à des récepteurs membranaires de type lectine.
La demi-vie des protéines plasmatiques varie largement entre environ vingt jours (IgG, albumine) et douze heures pour la protéine C-réactive (CRP). Il en va de même pour leur concentration comprise entre quelques dizaines de grammes (albumine) et quelques milligrammes (CRP). En pathologie, pour maintenir la pression oncotique, l'organisme tente dans certaines limites de réguler la protéinémie. C'est ainsi qu'au cours de la réponse inflammatoire l'augmentation de synthèse des protéines de la réponse inflammatoire (PRI) positives est compensée par une diminution de synthèse ou une augmentation du catabolisme des PRI négatives (albumine, transferrine, etc.), qu'au cours du syndrome néphrotique la fuite d'albumine est partiellement compensée par une augmentation de l'α2-macroglobuline (α2-M) et qu'au cours du myélome l'augmentation des immunoglobulines monoclonales est compensée par une diminution des immunoglobulines polyclonales ou de l'albumine.

## C. Distribution

Les protéines plasmatiques diffusent (en raison inverse de leur masse moléculaire) vers le secteur interstitiel soit par pinocytose au travers des cellules endothéliales ou au travers des jonctions interendothéliales.

## D. Fonctions physiologiques et biologiques majeures

- *La pression oncotique* assurée en majorité par l'albumine est quantitativement négligeable (< 1 %) par rapport à l'osmolalité plasmatique (~ 290 mOsm/kg). Elle exerce cependant une fonction fondamentale en retenant l'eau dans l'espace vasculaire selon le modèle de Starling.
- *Le transport* : portant aussi bien sur des substances exogènes (médicaments), qu'endogènes (lipides, métaux, hormones, etc.), ce transport est plus ou moins spécifique. Parmi les nombreuses protéines concernées, citons l'albumine, les *hormon-binding proteins* comme la *cortisol-binding protein*, la transferrine, etc.
- *La coagulation* : assurée par des protéines de structure (fibrinogène), des protéases (thrombine) et régulée par des antiprotéases (antithrombine III) ou d'autres protéases (plasmine).
- *L'immunité* : assurée par des immunoglobulines et le système du complément.
- *L'inhibition de protéases :* plasmatiques ou interstitielles (α2-M, α1-AT).

associées à la présence d'une paraprotéine sont la maladie de Kahler ou myélome multiple, la maladie de Waldenström, la maladie des chaînes lourdes et la maladie des chaînes légères. Précisons cependant que certains myélomes sont non secrétant et que certaines paraprotéinémies sont bénignes (surtout chez le sujet âgé).

#### b) Augmentation du fibrinogène

L'hyperfibrinémie s'observe surtout au cours d'un syndrome inflammatoire et dépasse rarement 10 g/L avec une protéinémie le plus souvent inférieure à 85 g/L.

#### c) Hémoconcentration

L'augmentation de la protéinémie est la conséquence de la seule diminution de la volémie, observée le plus fréquemment lors de déshydratations quelles que soient leurs étiologies et en principe sans augmentation de la quantité en protéines totales dans le compartiment plasmatique. L'aspect du protéinogramme et l'expression des fractions en pourcentages sont le plus souvent normal.

### 2. Hypoprotéinémies

Les hypoprotéinémies sont le plus fréquemment la conséquence d'une hypoalbuminémie :

- par défaut de synthèse hépatique liée à :
  - une carence d'apport en acides aminés par malnutrition ou malabsorption,
  - une insuffisance hépatique ;
- par fuite exagérée aux niveaux urinaire (syndrome néphrotique), digestif (entéropathie exsudative) ou cutané (brûlures) ;
- par hypercatabolisme.

*NB :* selon les étiologies, la fraction immunoglobuline peut être également diminuée. Les hypoprotéinémies par hémodilution peuvent théoriquement s'observer dans les hyperhydratations, mais ce signe est inconstant et n'est objectivé qu'au cours des rétentions sodées accompagnées d'hypervolémie, la plupart des autres étiologies étant accompagnées plutôt d'une hypovolémie conséquence d'une diminution du retour capillaire hydrique selon le modèle de Starling.

## C. Incidences de la protéinémie sur d'autres paramètres plasmatiques

Certains paramètres plasmatiques dépendent de la protéinémie pour des raisons physiologique (calcémie), analytique (natrémie) ou encore pour les deux (équilibre ionique). Il en résultera, en fonction de la conjoncture, une interprétation erronée de résultats faussement normaux ou anormaux.

### 1. Protéinémie et natrémie

L'activité de l'ion $Na^+$ mesurée en potentiométrie indirecte (c'est-à-dire sur l'échantillon après dilution) dépend du volume d'eau plasmatique contenue dans l'échantillon avant dilution. Schématiquement, un litre de plasma contient 140 mmol de sodium dissous dans 930 ml d'eau et 70 g de protéines (dont les lipoprotéines) occupant le volume restant de 70 ml (soit à peu près 1 ml/1 g de protéine). Les molarité et molalité du sodium sont donc respectivement de 140 mmol/L de plasma et 150 mmol/L d'eau plasmatique.

en règle consécutives aux hypoalbuminémies). En effet, le calcium fixé aux protéines est principalement lié à l'albumine majoritaire et très anionique. Il en résulte que la calcémie dosée comme reflet du calcium ionisé doit toujours être interprétée en fonction de la protéinémie (ou de l'albuminémie), notamment en cas d'hypoprotéinémie. En cas d'hyperprotéinémie, le plus souvent consécutive à une hyperglobulinémie, l'erreur est moins importante puisque la capacité de fixation du calcium par les globulines est nettement plus faible que la capacité de fixation par l'albumine.

Différentes formules sont proposées pour calculer la calcémie corrigée selon que l'on dispose de l'albuminémie ou de la protéinémie :

- Ca corrigée (mmol/L) = Ca mesurée (mmol/L) + [(45 – alb g/L) × 0,025], en considérant que l'albuminémie normale est de 45 g/L et que 1 g d'albumine transporte 1 mg ou 0,025 mmol de calcium ;
- Ca corrigée (mmol/L) = Ca mesurée (mmol/L)/[0,55 + (PT)/160], en postulant qu'une protéinémie normale (PT) est de 72 g/L et que le calcium lié aux protéines est de 45 % (72/160 = 0,45).

La première formule fondée sur l'albuminémie est la plus exacte, notamment en présence d'une hypoprotéinémie. La deuxième formule présente l'avantage d'éviter le dosage de l'albuminémie, mais elle est peu fiable dans les hyperprotéinémies du fait de la moindre fixation du calcium par les immunoglobulines.

*Conclusion* : une hypocalcémie en présence d'une hypoprotéinémie peut masquer un calcium ionisé normal voire augmenté. En revanche, lors d'une hyperprotéinémie, l'albuminémie étant rarement augmentée (sauf au cours des hémoconcentrations), une hypercalcémie correspond le plus souvent à une augmentation du calcium ionisé.

*NB* : la calcémie doit aussi être interprétée en fonction de l'équilibre acidobasique. Une acidose, en diminuant la charge anionique des protéines, diminue la fraction du calcium fixé sur les protéines. Ainsi, une hypocalcémie au cours d'une acidose peut masquer un calcium ionisé normal, voire augmenté, et inversement au cours d'une alcalose.

## III. Protéinogramme, ou électrophorèse des protéines sériques ou protidogramme

Le protéinogramme permet une analyse qualitative (éventuellement semi-quantitative) de l'ensemble des protéines *sériques* fractionnées selon leur *mobilité électrophorétique* U. Cette dernière est une fonction de la charge q, de la masse moléculaire M, et de la forme de chaque protéine : U = kq/M. Avec les supports actuels (gels d'agarose), les protéines sériques sont fractionnées à partir de l'anode en cinq *zones* de mobilités décroissantes : la fraction albumine et quatre groupes de globulines ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta$, $\gamma$). L'enregistrement densitométrique après coloration (non spécifique) permet de quantifier la part relative (%) de chaque fraction et d'évaluer sa concentration pondérale (g/L) connaissant la protéinémie. L'expression de chaque fraction en pourcentage objective un équilibre qui est rompu dans les dysprotéinémies. Cet équilibre est aussi mesuré par le rapport albumine/globulines (A/G) de valeur moyenne égale à 1,8. La protéinémie quant à elle permet de caractériser la véritable variation pondérale de chaque fraction.

## 1. Altérations dans la fraction γ

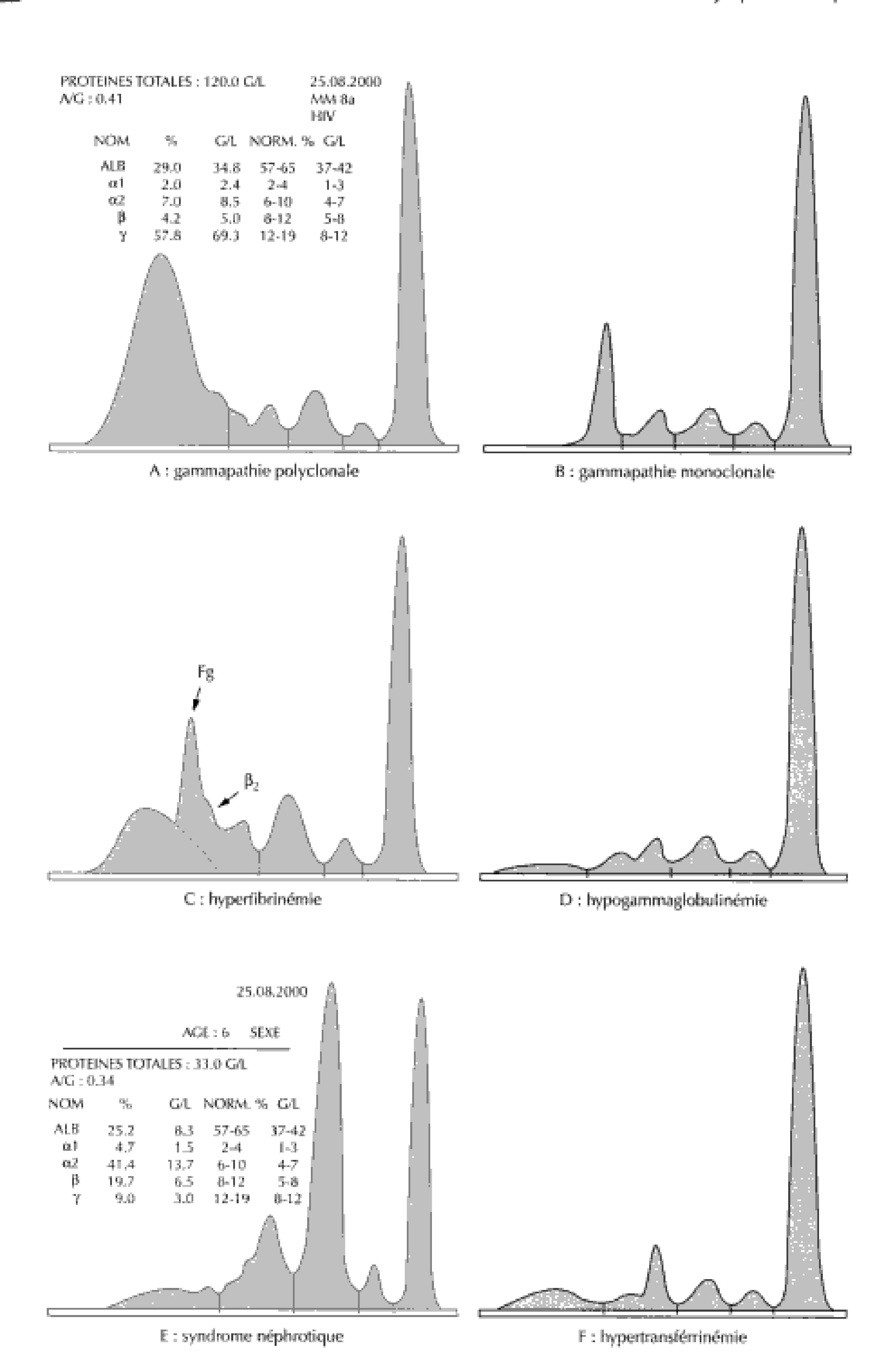
L'âge constitue le premier critère d'interprétation compte tenu des hypogammaglobulinémies physiologiques du nourrisson et de la fréquence des hypergammapathies monoclonales chez l'adulte âgé.

### a) Hypogammaglobulinémies (hypo-γ)

On peut les classer en fonction des circonstances d'apparition en :
- hypo-γ : physiologique et transitoire du nourrisson (*fig. 2D*) ;
- hypo-γ : des déficits immunitaires primitifs ;
- hypo-γ : iatrogènes (radiothérapie, immunosuppresseurs, corticoïdes) ;
- hypo-γ : parfois observée au cours du myélome, le plus souvent associée à un pic monoclonal.

### b) Les hypergammaglobulinémies (ou gammapathies ou dysglobulinémies)

Selon l'aspect, diffus ou présence d'une ou plusieurs bandes bien individualisées, on distingue les gammapathies poly-, oligo- et monoclonales :
- les gammapathies polyclonales (*fig. 2A*), qui sont observées au cours des stimulations antigéniques bactérienne, parasitaire (kala-azar ou leishmaniose viscérale), virale (sida), ou auto-immunes (lupus érythémateux disséminé ou LED). Le protéinogramme révèle une hypergammaglobulinémie pondérale (g/L) associée à une large bande en dôme dans la zone γ.
  *NB* : au cours de la cirrhose éthylique, on observe une hypergammaglobulinémie polyclonale à IgA, donc localisée dans la zone β-γ et conférant au protéinogramme le bloc β-γ bien décrit au cours de cette pathologie ;
- les gammapathies oligoclonales, qui correspondent à la présence de, au minimum, deux bandes bien individualisées révélées à partir d'un support suffisamment résolutif (agarose). Ces bandes traduisent une synthèse accrue d'anticorps de spécificité dirigée contre des antigènes du soi (maladies auto-immunes, immunosuppresseurs) ou contre des antigènes viraux (VIH, hépatite, méningite, etc.) ;
- les gammapathies monoclonales (*fig. 2B*), présentes dans les processus malins (myélome, maladie de Waldenström, leucémie lymphoïde chronique, lymphome) mais aussi bénins ;
  Le pic monoclonal est bien individualisé, de hauteur variable, le plus fréquemment de mobilité γ, ou β, plus rarement α2 et exceptionnellement α1, selon l'isotype G, M ou A de l'immunoglobuline. Le pic monoclonal peut être absent dans certaines gammapathies monoclonales (myélome non secrétant, maladie des chaînes légères), ou confondu avec d'autres protéines migrant dans des zones plus anodiques que la zone γ. Une hypogammaglobulinémie polyclonale d'accompagnement portant sur les trois classes G, A et M est constatée dans 30 % des cas de myélome.
  L'albuminémie (g/L) est souvent normale, bien que relativement (%) diminuée sur le protéinogramme (ex. : [PT] = 120 g/L, Alb (%) = 35 %, A/G = 0,53, Alb (g/L) = 42 g/L).




A : gammapathie polyclonale

B : gammapathie monoclonale

C : hyperfibrinémie

D : hypogammaglobulinémie

E : syndrome néphrotique

F : hypertransférrinémie

### 4. Altérations dans la fraction α1

- *Diminution* (*fig. 2H*) : portant sur l'orosomucoïde et/ou l'α1-antitrypsine (α1-AT) par fuite ou diminution de synthèse. Lorsque le déficit est localisé à la seule α1-AT, penser à un déficit congénital hétéro- ou homozygote (phénotype PiZZ).
- *Augmentation* (*fig. 2G*) : portant sur l'orosomucoïde et l'α1-AT au cours de la réponse inflammatoire aiguë. Elle est associée le plus fréquemment à une augmentation de la fraction α2 par synthèse accrue d'haptoglobine, autre protéine de la réponse inflammatoire aiguë.

### 5. Altérations dans la zone albumine

Évidemment, seule l'albumine est concernée.

- *Diminution* : par fuite (syndrome néphrotique) ou diminution de synthèse, (insuffisance hépatocellulaire, malnutrition). Dans ce cas, d'autres fractions α1, α2, β sont aussi diminuées.
- *Absence du pic* : analbuminémie congénitale. Affection très rare qui se caractérise par une augmentation des quatre autres fractions globuliniques pour maintenir la pression oncotique.
- *Dédoublement du pic ou bisalbuminémie* : la mobilité électrophorétique du nouveau pic peut être plus élevée ou plus faible. En fonction du caractère permanent ou transitoire du dédoublement, on distingue :
  - les variants génétiques d'expression permanente consécutive à une mutation d'un acide aminé modifiant la mobilité électrophorétique ;
  - les bisalbuminémies acquises : d'origine iatrogène (fixation d'un antibiotique sur l'albumine) ou après protéolyse partielle de l'albumine lors d'une fistule pancréatique.
- *Augmentations :* rares. En dehors d'une erreur analytique, elles sont consécutives à une hémoconcentration (l'expression du protéinogramme en pourcentages n'est pas ou peu modifiée) ou à une perfusion d'albumine.

## IV. Principaux marqueurs protéiques

Ces marqueurs sont choisis pour leur performance sémiologique dans le cadre de l'exploration de différents syndromes et pathologies définis dans l'*introduction*. Ainsi, ils permettent d'explorer des situations aussi diverses qu'une inflammation, une hémolyse, une carence martiale, une surcharge en fer, une insuffisance hépatocellulaire, une fuite rénale ou digestive, une dénutrition, etc.
Chaque protéine sera décrite sous forme de monographie avec ses principales propriétés physicochimiques et les étiologies à l'origine de ses variations pathologiques. Les valeurs de référence seront données à titre indicatif pour l'adulte, mais il faut savoir qu'elles sont susceptibles de varier largement en fonction de l'âge et, dans une moindre mesure, en fonction du sexe [exemple pour l'haptoglobine (*fig. 3*) : à la naissance (~ 0,10 à 0,30 g/L), entre 6 mois et 1 an (0,35 à 0,90 g/L), après 15 ans chez la femme (0,50 à 1,60 g/L)].

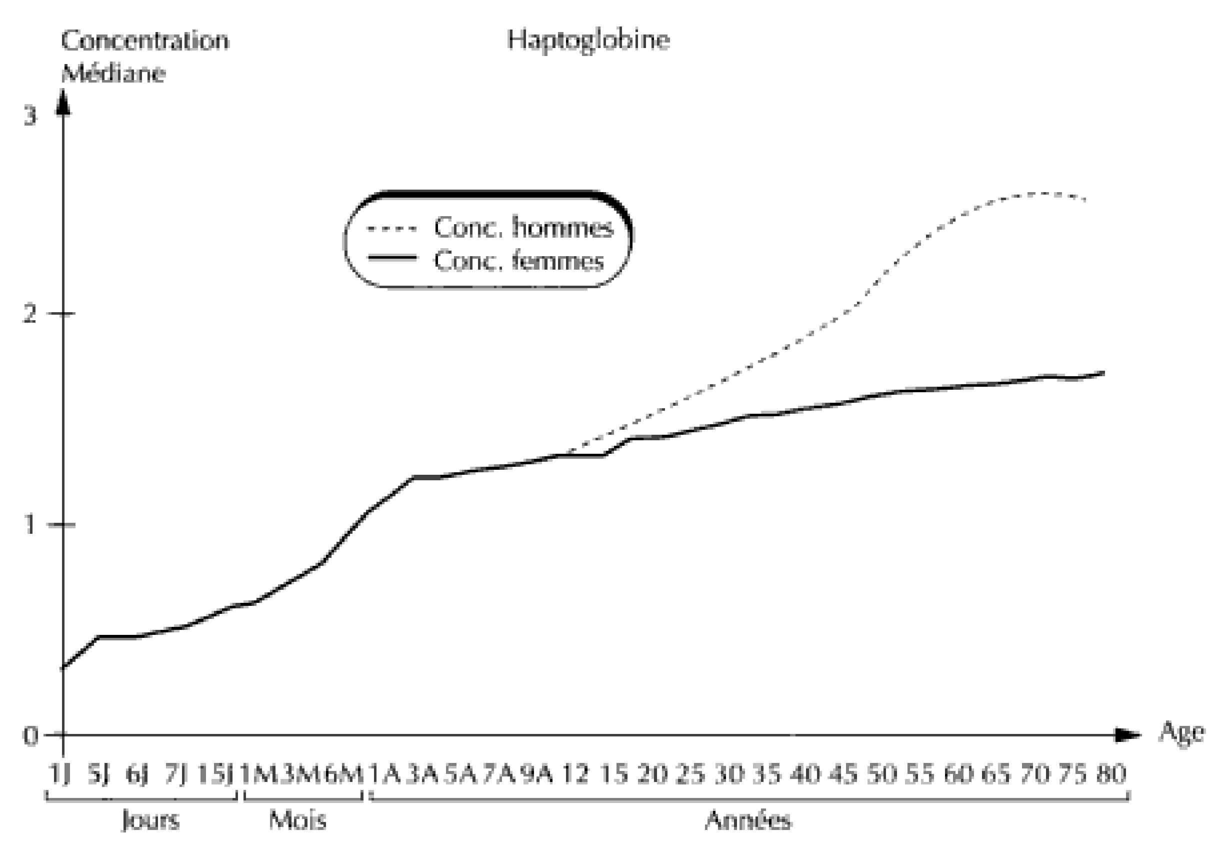



**Figure 3.** Médiane de la concentration en fonction de l'âge et du sexe (document Behring). En expression normalisée, chaque point de la courbe pour un âge donné est égal à 100 %

**Tableau 3.** Le dosage isolé d'une protéine peut conduire à une interprétation erronée

| | Augmentation | Diminution | Concentration résultante |
|---|---|---|---|
| Haptoglobine | Inflammation | Hémolyse | Normale |
| Transferrine | Carence en fer | Inflammation, dénutrition | Normale |
| Orosomucoïde | Inflammation | Syndrome néphrotique | Normale |
| Ferritine | Inflammation, cytolyse | Carence en fer | Normale |

Par ailleurs, un dosage isolé d'une protéine peut être la source d'interprétations erronées (*tab. 1*) lorsque coexistent plusieurs mécanismes agissant en synergie ou en opposition sur sa concentration *Exemple* : l'haptoglobine au cours d'un syndrome inflammatoire avec hémolyse peut être faussement normale (*fig. C*), conduisant à conclure à l'absence d'inflammation. De même pour la transferrine, qui peut être faussement normale lors d'une carence en fer associée à une inflammation.

Cette absence de spécificité totale pour le marqueur protéique a conduit au concept de profil protéique (PP). Le profil protéique consiste à doser plusieurs protéines corrélées positivement ou négativement entre elles pour explorer une pathologie (par exemple : l'orosomucoïde est corrélée positivement avec l'haptoglobine dans la réponse inflammatoire, mais négativement avec la transferrine et l'albumine). Cette association de plusieurs protéines présente au moins deux avantages :

- elle limite le risque d'interprétation erronée en cas de « dysvariation » d'une protéine ;
- la perte de corrélation entre deux protéines normalement corrélées apporte des informations sur des mécanismes pathologiques sous-jacents.

Pour que le profil protéique soit aisément exploitable et parfaitement reproductible pour une même situation physiopathologique, il a fallu s'abstraire des variations avec l'âge et le sexe. Pour ce faire, les valeurs pondérales (g/L) sont normalisées, c'est-à-dire exprimées en pourcentage de la médiane pour une tranche d'âge et un sexe définis. Cette expression normalisée facilite en outre les comparaisons des valeurs entre différentes protéines et entre différents laboratoires.

## A. Marqueurs de la réponse inflammatoire aiguë

Au cours d'une agression tissulaire, quelle qu'en soit l'étiologie, produit un afflux de macrophages qui vont libérer des cytokines au niveau du site agressé (IL1 et 6, TNF, etc.) qui, à leur tour, vont entraîner une réponse inflammatoire systémique et notamment la synthèse par l'hépatocyte des nombreuses protéines dites « de la réponse inflammatoire » (PRI). Parmi ces dernières, trois sont couramment dosées dans le cadre de l'exploration de la réponse inflammatoire aiguë : la protéine C-réactive (CRP), la procalcitonine (PCT), l'orosomucoïde (α1-glycoprotéine acide ou α1-GPA), l'haptoglobine.
Parmi les protéines dont la concentration est augmentée dans l'inflammation mais qui sont utilisées pour explorer d'autres pathologies, citons la céruloplasmine (Cp), l'α1-antitrypsine (α1-AT), le complément C3, le fibrinogène (Fg) et la ferritine.
À côté de ces protéines aussi appelées « marqueurs positifs de l'inflammation », d'autres protéines voient leur concentration diminuer dans la réponse inflammatoire et, de ce fait, sont dénommées « marqueurs négatifs ». Parmi ces derniers, citons l'albumine, la transferrine, la préalbumine.

La CRP, l'α1-GPA et l'haptoglobine sont les candidats qui satisfont le mieux aux critères idéaux définis par la commission Protéines de la Société française de biologie clinique (SFBC) pour explorer la réponse inflammatoire :
- cinétique rapide d'évolution : augmentation décelable dans le plasma six heures après le début de la réponse pour la CRP ;
- forte amplitude d'augmentation : concentration multipliée par trois à cent fois pour la CRP ;
- indépendance vis-à-vis de l'étiologie de l'inflammation conférant une bonne sensibilité diagnostique ;
- dépendance exclusive de l'inflammation conférant une bonne spécificité diagnostique.

Aucune de ces protéines ne remplissant tous ces critères, il paraît utile de les associer pour renforcer la robustesse de l'exploration.

### 1. Protéine C-réactive (CRP)

La protéine C-réactive est le marqueur le plus célèbre et le plus prescrit pour explorer la réponse inflammatoire. Son succès tient à la rapidité et à la forte amplitude de sa réponse, à sa spécificité totale (100 %) vis-à-vis de l'inflammation et à sa forte sensibilité diagnostique.
Il s'agit d'une holoprotéine constituée de cinq sous-unités identiques de masse moléculaire (5 × 23 017 Da = 115 085 Da). Son pHi est de 5,8 et elle migre en zone γ

L'haptoglobine fixe l'hémoglobine dans un rapport stœchiométrique 1/1 pour le phénotype 1-1. La demi-vie de l'HPT est d'environ trois jours mais elle est beaucoup plus courte pour le complexe HPT-Hb qui est rapidement épuré (~ 1 heure) par les cellules du système réticulo-endothélial (SRE).

- *Intervalle de référence chez l'adulte* : 0,50 à 1,60 g/L.
- *Augmentation* :
  - inflammation aiguë : l'augmentation de l'HPT (%) est corrélée positivement à celle de l'α1-GPA (%), sauf en cas d'hémolyse intravasculaire associée, où HPT % = α1-GPA % × (1,3 ± 0,2) ;
  - *NB* : l'augmentation de l'HPT semble présenter une spécificité totale vis-à-vis de l'inflammation (~ 100 %).
- *Diminution* :
  - hémolyses intravasculaires (hématomes, causes immunologiques, toxiques, infectieuses, mécaniques, anomalies de l'érythrocyte ou enzymatiques). Le sang contenant ~ 8 000 µmol d'hémoglobine et ~ 10 µmol d'haptoglobine, une faible hémolyse de 0,1 % (soit ~ 5 ml) sera suffisante pour consommer toute l'HPT. La diminution de l'HPT est donc un signe très sensible d'hémolyse intravasculaire ;
  - déficit congénital (rare, chez environ 3 % des Noirs).

## B. Marqueurs de l'immunité humorale

Seront traitées les trois principales classes d'immunoglobulines : G, A, M (pas les IgD et E) et le complément C3 fortement lié aux réponses immunitaire et inflammatoire.

### 1. Rappel des principales propriétés des immunoglobulines G, A, M

#### a) Immunoglobuline G (IgG)

- Glycoprotéine de MM ~ 150 000 Da (variable selon les sous-classes).
- *Demi-vie* : 7 à 21 jours, selon les sous-classes.
- *Lieu de synthèse* : plasmocyte.
- *Répartition* : ~ 50 % dans le secteur intravasculaire.
- *Intervalle de référence (adulte)* : 5,5 à 13 g/L.

#### b) Immunoglobuline A (IgA)

- Glycoprotéine sérique IgA (1 et 2) et sécrétoire IgAs, de MM respectives de 160 000 Da et 385 000 Da (IgA)2 avec la pièce sécrétoire.
- *Demi-vie* : quatre à neuf jours, selon les sous-classes.
- *Lieu de synthèse* : plasmocyte.
- Répartition : IgA sérique ~ 50 % dans le secteur intravasculaire.
- *Intervalle de référence (adulte)* : 0,50 à 3,50 g/L.

#### c) Immunoglobuline M (IgM)

- Glycoprotéine de MM ~ 900 000 Da (pentamère + pièce de jonction).
- *Demi-vie* : cinq jours.
- *Lieu de synthèse* : lymphoplasmocyte B.
- *Répartition* : ~ 80 % dans le secteur intravasculaire. Intervalle de référence : 0,60 à 2,00 g/L.

Hidden page

- *Diminution* :
  - déficit de synthèse en apo Cp (très rare) ;
  - déficit secondaire en Cp par défaut d'incorporation du cuivre (Cu+) dans l'apo Cp par défaut d'une ATPase réductrice du Cu2+ (maladie de Wilson) ou d'une protéine de liaison du cuivre (CuBP) à l'origine d'un défaut d'absorption du cuivre alimentaire (maladie de Menkès). Dans les deux cas, l'apo Cp étant rapidement catabolisée, la Cp plasmatique est diminuée ;
  - déficit nutritionnel en cuivre : on observe, comme pour la carence en fer, une anémie hypochrome microcytaire.

## G. Bêta-2-microglobuline (β2-M)

La β2-microglobuline est une protéine de MM 11 800 Da, localisée sur la membrane cellulaire de toutes les cellules nucléées où elle constitue la chaîne légère des Ag du système HLA (*human leukocyte antigen* ou antigène des leucocytes humains) de classe I. Elle est ensuite libérée dans le secteur extracellulaire et le sérum au cours de la régénération cellulaire. La concentration en β2-M sérique résulte d'un équilibre entre synthèse et catabolisme rénal par filtration glomérulaire et réabsorption tubulaire à 99,9 %.

- *Intervalle de référence chez l'adulte* :
  - β2-M sérique : 0,8 à 2,4 mg/L ;
  - β2-M urinaire : 33 à 36 μg/24 h ou ≤ 200 μg/g créatinine.
- *Augmentation* :
  - des taux élevés en β2-M sont observés dans toutes les pathologies associées à une multiplication des lymphocytes (principale cellule de synthèse de la β2-M) comme les infections, maladies immunes, hémopathies malignes, VIH ;
  - dans l'IRC, la β2-M sérique est augmentée par diminution de la filtration glomérulaire.

*NB :* la β2-M urinaire est utilisée comme marqueur d'atteinte tubulaire, mais c'est un marqueur peu fiable car instable lorsque le pH urinaire est < 6,5.

## H. Alpha-1-microglobuline (α1-M)

L'α1-microglobuline est une glycoprotéine de MM 33 000 Da, filtrée librement par le glomérule et réabsorbée à 99,8 % par le tubule proximal.

C'est le marqueur d'atteinte tubulaire qui semble en pratique le plus fidèle. Il est en effet stable dans les urines (contrairement à la β2-M), sa concentration urinaire normale est suffisamment élevée pour se prêter à un dosage automatisé, et dépend faiblement de facteurs extrarénaux (contrairement à la β2-M et à la RBP urinaires).

- *Valeurs usuelles urinaires* : < 12 mg/L ou < 20 mg/24 h ou < 0,17 mg/mmol créatinine.
- *Augmentation dans les urines* : atteintes tubulaires (spécificité ~ 100 %), IRC (par augmentation de la concentration plasmatique en α1-M).

*NB :* la RBP urinaire apporte les mêmes informations que l'α1-M mais, sa concentration étant plus faible, son dosage est beaucoup plus délicat et manque de sensibilité.

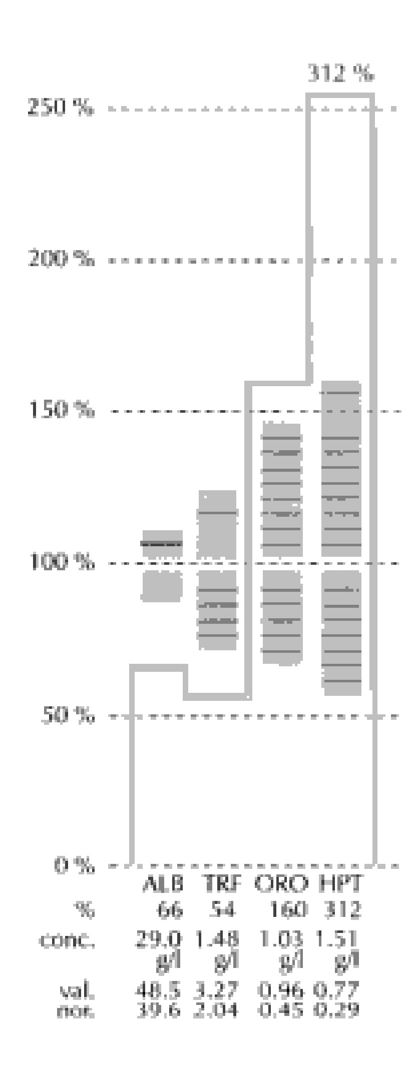



**Figure 4B.** Réponse inflammatoire qui semble chronique car transferrine et albumine sont toutes deux diminuées. En effet, TRF et Alb sont des protéines à réponse négative dans l'inflammation. Remarquons chez ce garçon de 3,5 mois les valeurs usuelles différentes du cas précédent. Par exemple, pour HPT, la médiane est ici de 0,48 g/L contre 0,81 g/L. Ces deux valeurs très différentes correspondent toutes deux à une même valeur normalisée (100 %)

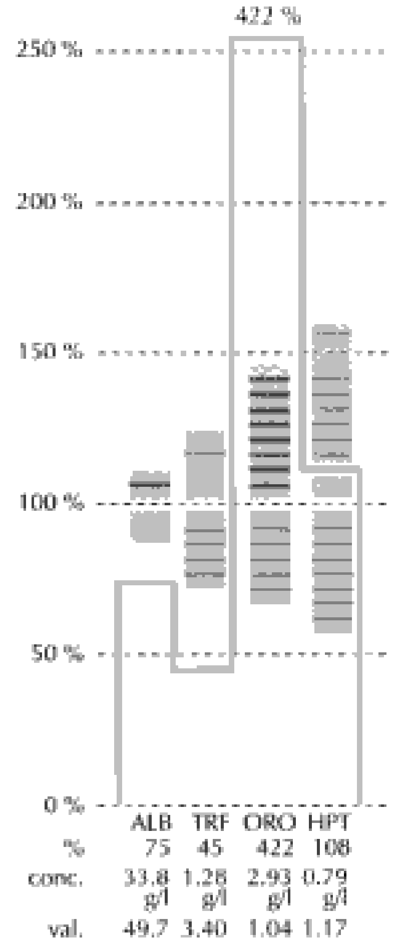



**Figure 4C.** Chez ce garçon de 2 ans, nous sommes en présence d'un syndrome inflammatoire très important subaigu ou chronique du fait des diminutions d'albumine et de transferrine. L'haptoglobine non corrélée à l'α1-GPA est faussement normale et témoigne ici d'une hémolyse intravasculaire surajoutée. La TRF paraît trop diminuée par rapport à l'Alb, d'autant qu'il existe une carence en fer à 5,5 µmol/L qui, en principe, devrait plutôt augmenter la transferrine. Cette carence en fer n'est pas objectivée par la ferritine, qui chez cet enfant est au contraire augmentée à 301 µg/L du fait de l'inflammation

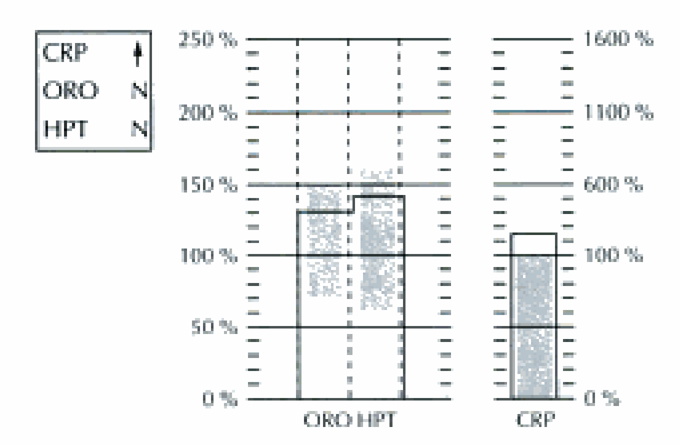



**Figure 4D.** On constate une dissociation entre, d'une part, la CRP qui est légèrement augmentée, et l'α1-GPA et l'HPT qui sont normales. On peut évoquer : une inflammation débutante (< 36 h) ou une inflammation dans un contexte de forte insuffisance hépatocellulaire

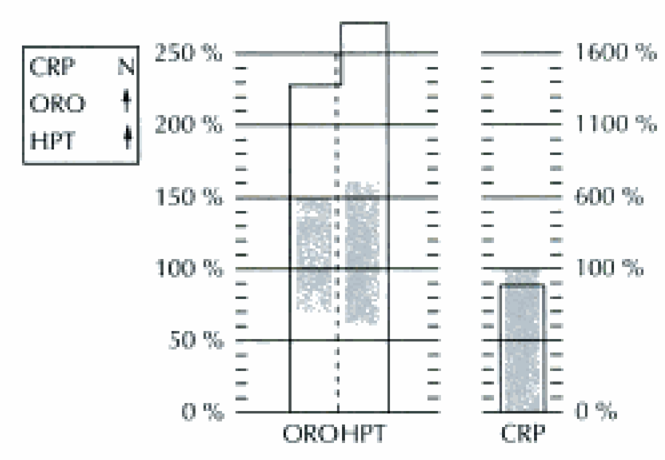



**Figure 4E.** Ici, la dissociation est observée entre la CRP normale et le couple α1-GPA – HPT augmenté. On peut évoquer : une inflammation en voie de guérison, la CRP se normalisant d'abord du fait de sa demi-vie plus courte, ou une inflammation avec une réponse faussement négative de la CRP (sensibilité < 100 %), par exemple au cours des infections virales ou du lupus

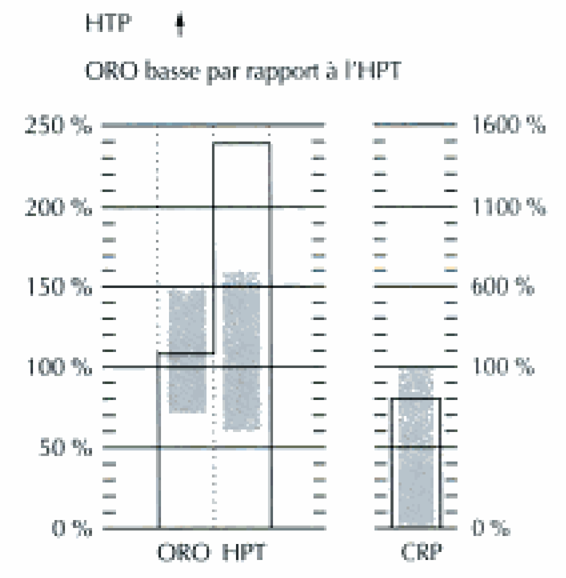



**Figure 4F.** On constate une dissociation α1-GPA/HPT inverse de celle de la figure 4C, suggérant : une fuite glomérulaire syndrome néphrotique avec inflammation surajoutée ou une inflammation en voie de guérison (α1-GPA se normalise avant HPT), ou encore la prise de médicaments basiques se fixant sur l'α1-GPA et diminuant sa demi-vie

Sexe : homme
Age : 40 ans

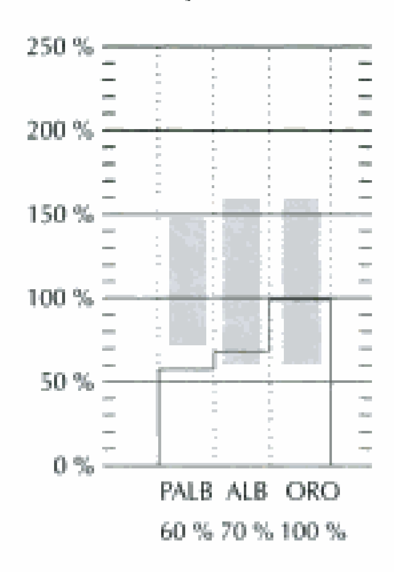



**Figure 4G.** Il s'agit d'une dénutrition chronique démontrée par la baisse de deux marqueurs nutritionnels à demi-vie courte (pAlb ou préalbumine) et longue (Alb)

Sexe : femme
Age : 70 ans

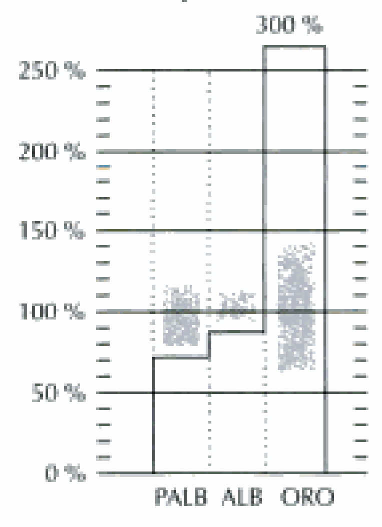



**Figure 4H.** Il s'agit d'une inflammation démontrée par l'$\alpha$1-GPA très augmenté, mais probablement sans dénutrition, les faibles diminutions du couple Alb/Alb étant consécutives

Sexe : homme
Age : 40 ans

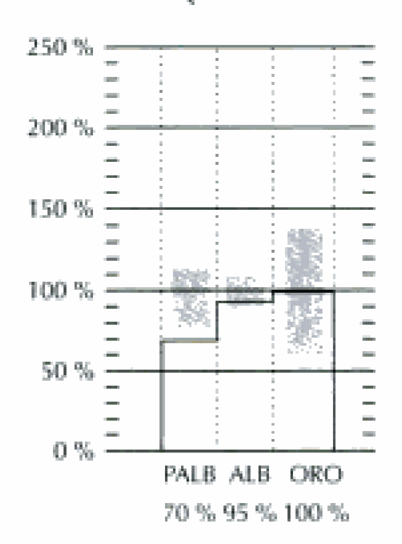



**Figure 4I.** On peut évoquer une dénutrition à son début sur la base de la diminution isolée de la pAlb

## L'essentiel de la question

Les protéines totales plasmatiques ou sériques peuvent être analysées quantitativement par le dosage de la protéinémie ou qualitativement par l'aspect du protéinogramme. En outre, certaines protéines d'intérêt sémiologique peuvent être dosées individuellement pour explorer divers syndromes ou pathologies. Les protéines plasmatiques sont synthétisées principalement par l'hépatocyte à l'exception des immunoglobulines produites par les plasmocytes. Elles assurent des fonctions biologiques très diverses (pression oncotique, transport, défense, etc.) et plus ou moins définies. La protéinémie augmente avec l'âge pour se stabiliser entre 65 et 80 g/L chez l'adulte. Une variation de la protéinémie est évocatrice d'une anomalie quantitative portant sur une protéine majeure du plasma (albumine, immunoglobuline) et/ou d'une variation de la volémie. Ainsi les hyperprotéinémies traduisent le plus souvent une hypergammaglobulinémie ou une hémoconcentration, tandis qu'une hypoprotéinémie témoigne plutôt d'une hypoalbuminémie et plus rarement d'une hémodilution. Les valeurs de la natrémie, de la calcémie et de la balance ionique doivent être interprétées en fonction de la protéinémie.

En cas d'hyperprotéinémie, le protéinogramme est un complément d'exploration incontournable en objectivant ou non une éventuelle dysprotéinémie poly- ou monoclonale. Le protéinogramme demeure utile (mais non indispensable) pour explorer de nombreuses autres pathologies comme les syndromes néphrotiques, inflammatoire, d'insuffisance hépatocellulaire, les déficits en immunoglobulines ou en α1-antitrypsine (α1-AT), les fuites protéiques, la dénutrition.

Le dosage individualisé de marqueurs protéiques de spécificité et sensibilité diagnostiques variables permet une investigation plus précise de ces pathologies. Ainsi pour la réponse inflammatoire, la protéine C-réactive (CRP) est actuellement considérée comme le meilleur marqueur. L'α1-glycoprotéine acide (α1-GPA) présente un intérêt particulier en cas de réponse faussement négative de la CRP ou pour confirmer une évolution favorable. L'haptoglobine exprimée en valeur normalisée (%) est normalement positivement corrélée à l'α1-GPA. Une perte de corrélation par diminution de l'haptoglobine est un signe très sensible d'une hémolyse intravasculaire. Le dosage des immunoglobulines G, A, M est très utile pour explorer de très nombreuses pathologies associées à un dysfonctionnement de l'immunité humorale. Les variations du composé C3 du complément témoignent d'une pathologie à composante immune ou inflammatoire. La préalbumine est considérée comme le meilleur marqueur protéique de l'état nutritionnel. Mais n'étant pas totalement spécifique, puisqu'elle est susceptible de diminuer aussi au cours des inflammations, il semble judicieux de lui associer un marqueur de l'inflammation de même demi-vie comme l'α1-GPA pour renforcer la fiabilité de l'interprétation.

La transferrine et la ferritine sont les deux principaux marqueurs protéiques du statut en fer mais, là encore, leur spécificité est loin d'être totale, la transferrine diminuant et la ferritine augmentant dans les inflammations chroniques. Comme précédemment, la prescription d'un marqueur inflammatoire comme l'α1-GPA renforce la qualité de l'interprétation. En outre, la spécificité d'une hypoferritinémie vis-à-vis d'une carence en fer est voisine de 100 %.

L'α1-antitrypsine et la céruloplasmine sont deux marqueurs classiquement prescrits en cas de suspicion d'un déficit héréditaire portant sur la quantité de protéine sécrétée ou sur sa structure et donc sa fonctionnalité.

# L'infarctus du myocarde

B. BAUDIN
Service de Biochimie A, Hôpital Saint-Antoine, Paris, et UFR de pharmacie, Paris XI.

*L'infarctus du myocarde (IDM) est un accident cardiovasculaire gravissime s'accompagnant de complications mortelles parfois rapides ou de séquelles cardiaques morbides, mortelles à plus ou moins long terme. Actuellement, l'IDM s'inscrit dans le cadre du paradigme de syndrome coronarien aigu (SCA) qui regroupe des aspects clinico-biologiques, endoscopiques (coronarographie) et thérapeutiques (chirurgie, médicaments, mesures hygiéno-diététiques). L'identification de la phase de nécrose est essentielle à la prise en charge thérapeutique et comme l'ECG n'est pas toujours contributif ni la douleur suffisamment spécifique, c'est la mesure de marqueurs biochimiques plasmatiques qui aidera à prendre la décision thérapeutique et à son choix, éventuellement après vérification par coronarographie. Les trois grands marqueurs successivement développés dans ce cadre de prise en charge ont été : la créatine-kinase (CK), la CK-MB et la troponine I (ouT), les troponines étant à l'heure actuelle les marqueurs les plus intéressants en terme de spécificité et de sensibilité, même s'ils peuvent encore paraître imparfaits.*

# I. Pathogénie

## A. Définition

L'infarctus est une lésion définitive, ou nécrose, d'un tissu ou d'un organe provoquée par l'obstruction de l'artère qui assure son irrigation. Dans l'infarctus du myocarde (IDM), la diminution de l'apport sanguin est due à un rétrécissement ou à une obstruction d'une des artères qui irriguent le cœur, les artères coronaires. Dans 40 % des cas, l'IDM s'accompagne de complications mortelles, dont près de la moitié surviennent dans la première heure de l'infarctus. Les morbidité et mortalité postinfarctus à court et moyen termes restent élevées malgré les progrès de la prise en charge et de la prévention.

## B. Circonstances de survenue

La lésion de base responsable de l'IDM consiste dans le développement anormal, dans la paroi des artères coronaires, d'une plaque formée de graisses, l'athérome. Progressivement, la plaque rétrécit le calibre des vaisseaux (sténose) et peut finir par l'obstruer. Certains points de la plaque d'athérome s'ulcèrent. S'y déposent des caillots sanguins (thrombose) qui peuvent achever d'oblitérer le tronc artériel. Parallèlement, la paroi de l'artère se charge de calcaire et perd son élasticité normale : c'est la sclérose artérielle. Au niveau des artères coronaires, l'athérome prédomine aux premiers centimètres des troncs artériels après leur naissance à la base de l'aorte et épargne généralement les branches qui traversent la paroi du cœur (branches intramurales). Les lésions sont souvent multiples, touchant deux des trois troncs coronaires, sinon les trois. La plupart du temps, ces lésions se généralisent à tout ou partie de l'arbre artériel et atteignent en particulier l'aorte abdominale, l'aorte thoracique, les artères mésentériques, les artères des jambes, les artères cérébrales, etc. L'IDM, comme l'artérite des membres inférieurs et plus de la moitié des accidents vasculaires cérébraux, ou encore l'infarctus mésentérique, intervient dans un contexte d'athérosclérose généralisée.

L'infarctus du myocarde survient le plus souvent sur un angor chronique en cours d'aggravation (crises angineuses répétées, angor instable, état de mal angineux, etc.). Il est par ailleurs de plus en plus évident que l'IDM peut survenir en présence d'une lésion minime, donc sans oblitération coronaire. Ce serait un spasme, donc une contraction temporaire de la paroi artérielle, qui provoquerait une diminution, voire une abolition, de la lumière des vaisseaux. Il semblerait même que la thrombose coronarienne soit plus une conséquence de l'IDM qu'une cause. Elle reste néanmoins une évolution morbide et la cause de nombreux décès tardifs ou à distance de l'accident initial. Toutes ces étapes évolutives, de l'angor simple à l'IDM constitué, sont maintenant réunies dans le nouveau paradigme de syndrome coronarien aigu (SCA).
Lorsqu'une sténose ou une oblitération des artères s'est constituée, se développe tôt ou tard un réseau de vaisseaux de suppléance qui vient compenser l'insuffisance circulatoire coronarienne : il s'agit d'une néovascularisation. Il existe un lien étroit entre l'apport d'oxygène au myocarde et sa contraction. Les anomalies de l'électrocardiogramme apparaissent ultérieurement et traduisent une diminution de l'activité de la pompe à sodium. Cette pompe conduit à faire pénétrer du sodium et de l'eau dans la cellule au repos et réduit ainsi l'efficacité du processus dépolarisation-repolarisation et donc de la contraction. Enfin, le ralentissement de l'apport d'oxygène entraîne une diminution puis un arrêt des processus qui fournissent de l'énergie à la cellule sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) et de phosphocréatine, donc la glycolyse aérobie essentiellement. Tous ces événements mènent à une souffrance de la cellule myocardique qui finit par mourir en présentant la cascade des signes de nécrose avec condensation de l'ADN nucléaire, gonflement et éclatement mitochondrial, désorganisation du cytosquelette, éclatement des lysosomes qui libèrent leur contenu en enzymes protéolytiques. La membrane devient perméable et laisse échapper des peptides et protéines dont certains serviront au diagnostic de l'IDM par leur dosage dans le plasma sanguin. Le foyer de nécrose est le siège d'un processus de réparation avec successivement afflux de cellules phagocytaires, néovascularisation et envahissement par une trame fibreuse de collagène. Pendant les trois premiers mois de son évolution, ce foyer peut se rompre à tout moment et provoquer un nouvel infarctus. Même achevé, le tissu cicatriciel n'a jamais toutes les qualités d'un tissu myocardique normal. Selon sa localisation et son étendue, il peut modifier le bon fonctionnement du cœur.

## C. Complications

Le point de non-retour est difficile à déterminer, mais il semble se situer avant la trentième minute qui suit l'obstruction de l'artère coronaire. En outre, une revascularisation trop tardive semble provoquer une aggravation des lésions. C'est un syndrome d'ischémie-reperfusion qui a longtemps paru paradoxal. Tout cela limite les indications de la chirurgie dans le traitement des IDM récents. Dans un certain nombre de cas, l'IDM évolue favorablement mais, s'il est très étendu, expose à différentes complications. La nécrose des cellules contractiles peut entraîner une diminution brutale des capacités de la pompe cardiaque : c'est l'insuffisance cardiaque aiguë qui s'accompagne très vite d'un œdème pulmonaire dû à l'engorgement du sang dans les vaisseaux pulmonaires et d'une insuffisance circulatoire périphérique. La diminution du débit sanguin au niveau des reins entraîne une diminution

de l'émission urinaire menant au tableau d'insuffisance rénale fonctionnelle. Certaines localisations de la nécrose initiale sont incompatibles avec la survie, comme la création d'une communication interventriculaire ou l'entrave au fonctionnement de la valvule gauche. L'IDM est une cause de mort subite et, parfois, la justification de certaines tentatives chirurgicales héroïques, réalisées à l'aide d'une réanimation cardiovasculaire lourde, en particulier grâce à la mise au point de divers types d'assistance circulatoire et divers modèles de cœurs artificiels.
Toute une série de troubles du rythme et de la conduction intracardiaque peuvent s'observer dans les premières heures et les premiers jours de l'évolution de l'IDM. Si le foyer malade touche un centre d'automatismes, il peut provoquer un dérèglement responsable de battements trop rapides (tachycardie). Au contraire, si une voie de conduction est sectionnée, ce sera un ralentissement du rythme des battements cardiaques (bradycardie).
La troisième des complications les plus fréquentes de l'IDM est l'accident thromboembolique. Les thromboses peuvent se constituer à l'intérieur d'une veine ou d'une cavité cardiaque : une thrombose veineuse peut être à l'origine d'une embolie pulmonaire, une thrombose endocavitaire à celle d'embolies artérielles, en particulier cérébrales.

## D. Thérapeutique

### 1. En urgence

Le traitement s'impose en urgence, en unité de soins intensifs sous surveillance clinique, biologique et électrocardiographique (ECG) continue par monitorage. Le traitement médicamenteux associe toujours un antalgique (morphine ou succédané, aspirine) à une tentative de reperfusion par thrombolyse (par le tPA essentiellement) ou de limitation d'extension de la thrombose coronarienne par un anticoagulant de type héparine. Les dérivés nitrés administrés par voie intraveineuse gardent un intérêt certain. Les bêtabloqueurs semblent favorablement s'associer à la thrombolyse ; les anticorps anti-GPIIb-IIIa à fonction antiagrégant plaquettaire ont maintenant une place bien définie dans la prise en charge des syndromes coronariens aigus. Les complications précoces sont traitées spécifiquement. L'angioplastie coronaire directe reste difficilement applicable en pratique courante. L'intérêt des pontages des coronaires en urgence a été démontré pour des patients en choc cardiogénique et la chirurgie garde toute sa place dans les complications mécaniques.

### 2. Période postinfarctus

Si une thrombolyse intraveineuse a été instituée, elle sera relayée par une héparinothérapie. Si l'héparine a été utilisée d'emblée, le relais sera pris par les antivitaminiques K avec période de chevauchement des deux thérapeutiques. À l'antalgique succédera un sédatif ou un tranquillisant. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I, instaurés le lendemain de l'accident, diminuent la mortalité et la morbidité postinfarctus. Ils sont particulièrement utiles si le risque d'insuffisance cardiaque est élevé. Les traitements antiarythmiques et les antagonistes calciques ne sont

prescrits que dans des indications précises. L'angioplastie sous coronarographie sélective avec implantation d'une endoprothèse (stent) ou le pontage aortocoronarien, à distance de la période aiguë, peuvent être envisagés en cas d'ischémie récurrente.

### 3. Prévention

Quelle que soit l'évolution, le malade reste menacé par trois risques majeurs :
- la mort subite, menace constante chez tout coronarien ;
- la récidive d'infarctus (un malade sur deux fera un nouvel infarctus dans les mois ou les années suivantes) ;
- les autres accidents évolutifs de l'athérosclérose.

C'est la raison pour laquelle l'accent est mis sur la prévention. Le rôle de l'hypertension, du tabac, du diabète, de l'obésité, de la sédentarité comme facteurs de risque de l'IDM a été amplement vérifié. Il semble bien, à l'heure actuelle, que la correction hygiéno-diététique de ces facteurs soit la méthode la meilleure et la plus économique pour diminuer l'incidence et la mortalité de l'infarctus aussi bien en prévention tertiaire (postinfarctus), secondaire (avant tout accident ischémique, cardiaque ou non) en fonction de la présence de facteurs de risque, que primaire en s'adressant à toute la population indépendamment des facteurs de risque reconnus dans cette population.

# II. Diagnostic biologique

## A. Place du diagnostic biologique

L'OMS définit le diagnostic d'IDM sur l'association de deux des trois critères suivants :
- survenue d'une douleur évocatrice ;
- modification de l'ECG avec onde T, sus-décalage ST et onde Q de nécrose ;
- élévation dans le plasma sanguin de substances biochimiques libérées par la lyse du cardiomyocyte.

L'onde Q de nécrose ne peut être caractéristique qu'entre la quatrième et la septième heure après la douleur initiale. Le sus-décalage ST signale une lésion sous-épicardique, il est le plus précoce. L'ischémie sous-épicardique se signale par une onde T géante mais à partir de la 48$^{e}$ heure. Selon les études, 10 à 50 % des patients ayant un IDM en cours d'évolution n'avaient pas de signes caractéristiques sur l'ECG (faux négatifs). Par ailleurs, beaucoup de ces signes sont atypiques (faux positifs). C'est la comparaison des tracés répétés ou des tracés de différence qui apportera le plus de renseignements diagnostiques et pronostiques. Sur les seuls éléments de clinique (douleur rétrosternale constrictive) et de l'ECG, le diagnostic différentiel n'est pas toujours facile à réaliser avec l'embolie pulmonaire, la dissection aortique, la péricardite aiguë. Ce diagnostic différentiel peut aussi être perturbé par des douleurs abdominales qui irradient au sternum : colique hépatique, perforation d'ulcère, pancréatite aiguë.

Dans tous ces cas difficiles, ce sont des ECG répétés et des dosages biochimiques qui porteront le diagnostic d'IDM et permettront d'instaurer la thérapeutique efficace,

mais c'est l'existence du sus-décalage ST qui sous-tend la décision thérapeutique dans le paradigme de SCA. À ces symptômes s'ajouteront les signes biologiques des conséquences systémiques de l'IDM avec un syndrome inflammatoire, une insuffisance rénale fonctionnelle due au choc vasculaire, une hyperhydratation extracellulaire par l'insuffisance cardiaque, une anoxie tissulaire avec hyperlactacidémie et acidose métabolique et, enfin, un état d'hypercoagulabilité sanguine fréquent.

## B. Marqueurs biochimiques

Le marqueur biochimique idéal devra être précoce, sensible et spécifique. Il devrait pouvoir quantifier la zone infarcie et permettre de suivre la reperfusion thérapeutique. Il peut éventuellement présenter un intérêt rétrospectif et permettre de suivre les lésions myocardiques minimes. De plus, sa méthode de dosage doit être fiable et compatible avec l'urgence.

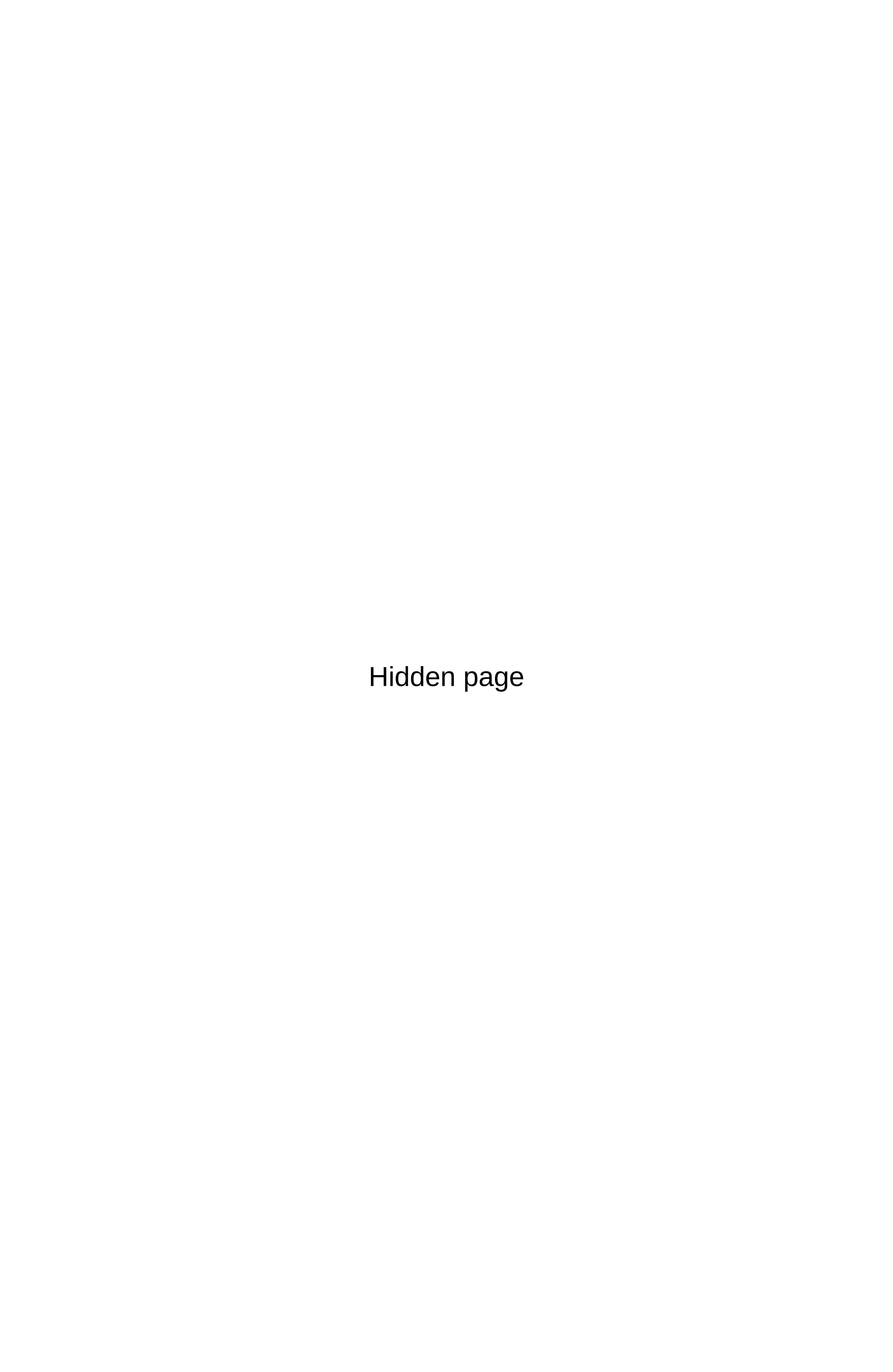
## C. Marqueurs actuels

### 1. Transaminases (ASAT et ALAT)

Les deux transaminases d'intérêt en biochimie clinique, l'aspartate aminotransférase (ASAT, EC 2.6.1.1) et l'alanine aminotransférase (ALAT, EC 2.6.1.2), n'ont pas les mêmes répartitions tissulaires. L'ASAT étant plus largement présente dans le cytosol des cardiomyocytes, elle s'élèvera plus précocement dans le plasma sanguin et de façon plus caractéristique au cours de l'IDM. L'ASAT ne s'élève qu'à partir de la dixième heure avec un maximum vers 36 heures, ce qui est bien trop tardif pour mettre en route un traitement efficace. Il existe une isoASAT mitochondriale que l'on peut séparer de l'isoenzyme cytosolique par électrophorèse ou chromatographie d'échange d'ions. Son élévation dans le plasma va signer des dégâts cellulaires irréversibles, mais elle est encore plus tardive et la spécificité cardiaque demeure mauvaise. En particulier, ces deux formes de l'ASAT augmentent beaucoup dans la cytolyse hépatique, il est vrai conjointement à l'ALAT. Inversement, l'élévation de cette dernière au cours de l'IDM peut signaler un syndrome de postcharge hépatique relié à l'insuffisance ventriculaire droite. Il reste donc intéressant de suivre l'évolution du rapport ASAT-ALAT.

### 2. Lacticodéshydrogénase (LDH)

La lacticodéshydrogénase, ou lactate déshydrogénase, LDH (EC 1.1.1.27), de localisation cytosolique uniquement, est un marqueur de cytolyse très polyvalent, donc bien peu spécifique du myocarde. En outre, son augmentation est tardive (vers la 18$^{e}$ heure). En revanche, à la phase de plateau vers la 48$^{e}$ heure, la LDH serait un reflet du volume infarci. La spécificité cardiaque est meilleure si l'on s'intéresse à l'isoenzyme présente majoritairement dans le cœur. La LDH est un tétramère formé de l'association de deux protomères codés par des gènes différents. Cela permet cinq associations tétramériques différentes. Dans le cardiomyocyte, le gène B est le plus exprimé, on retrouve donc essentiellement l'homotétramère B4, ou LDH-1, car la plus rapide en électrophorèse.


Hidden page

dosage de la CK-MB a longtemps été indirect, surtout en utilisant l'immuno-inhibition par un anticorps antiM polyclonal suivi du dosage de l'activité CK résiduelle qui devait correspondre à la moitié de la CK-MB, résultat bien sûr totalement faux en présence de CK-BB, d'une macroCK ou encore d'une CK résistante à l'immuno-inhibition. Cette méthode devrait maintenant être totalement proscrite. La séparation chromatographique de la CK-MB était longue et peu précise. La séparation électrophorétique avec révélation fluorimétrique *in situ* reste la référence si l'on s'intéresse à l'ensemble des isoCK, et c'est la seule méthode qui puisse caractériser la CK-BB et les macroCK. Pour la CK-MB, elle reste longue et peu précise. Un progrès notoire a été obtenu avec le dosage pondéral direct de la CK-MB. Il s'agit, bien entendu, de méthodes immunochimiques utilisant un anticorps antiMB monoclonal en radio-immunodosage ou plutôt en immunoenzymofluorimétrie actuellement.
Les CK-MM et CK-MB présentent aussi des isoformes de séquence. La carboxypeptidase N contenue dans le sang hydrolyse leur extrémité C-terminale avec perte séquentielle de lysines (Lys). Ainsi, la forme entière ($MM_3$) de la CK-$MM_3$ sera transformée en $MM_2$ (moins 1 Lys) puis $MM_1$ (moins 2 Lys). Chez l'individu sain, la $MM_1$ (la plus rapide à l'électrophorèse car contenant moins de lysine basique) est prépondérante. Lors d'un IDM, le rapport $MM_3$-$MM_1$ augmente par l'arrivée massive de $MM_3$ cellulaire non hydrolysée. Cette augmentation est précoce (dès deux heures) et courte (maximum à quatre heures) en revenant à la normale en 24 heures, mais elle n'est pas plus spécifique de l'IDM que la CK totale. Pour la CK-MB, on ne retrouve que deux formes, la $MB_2$ entière et la $MB_1$ délysinée. Au cours de l'IDM, le rapport $MB_2$-$MB_1$ augmente mais, comme la concentration de CK-MB est faible, la spécificité cardiaque devient mauvaise. En définitive, à l'heure actuelle, l'élévation de la CK totale reste caractéristique de l'évolution d'un IDM. Afin d'améliorer sensibilité et spécificité, il faut savoir doser la CK-MB par une méthode fiable, ou éventuellement mesurer le rapport $MM_3$-$MM_1$.

## 4. Myoglobine

La myoglobine est un polypeptide de 17,8 kDa présentant de fortes homologies avec les chaînes de globine. C'est l'intermédiaire de liaison de l'oxygène moléculaire dans le myocyte. Tous les muscles squelettiques striés en contiennent de fortes concentrations sous forme soluble. Une faible quantité passe physiologiquement dans le plasma sanguin. La myoglobine subit la filtration glomérulaire rénale et est partiellement réabsorbée par pinocytose au niveau tubulaire mais avec un seuil, fixé à 200 ng/ml, au-delà duquel elle apparaît dans les urines : c'est une myoglobinurie. Ce métabolisme est lié à sa masse moléculaire très faible et sa bonne hydrosolubilité. On retrouvera une hypermyoglobinémie dans deux situations bien distinctes :
- l'excès de libération par lésion des membranes des cellules qui la contiennent, c'est le cas dans l'IDM dès la phase précoce mais aussi dans les autres myolyses ;
- le défaut d'élimination urinaire dans l'insuffisance rénale.

La myoglobine peut être dosée par des méthodes immunochimiques : immunoenzymofluorimétrie ou immunonéphélémétrie ou même immunoturbidimétrie. Dans le contexte de l'IDM, son intérêt réside dans la précocité de son élévation, qui est elle-même très importante quantitativement, faisant de la myoglobine un marqueur sensible de l'IDM. Sa concentration peut être multipliée par dix en une à

trois heures après la douleur avec un maximum entre huit et douze heures. Le retour à la normale est court lui aussi, guère plus de 24 heures. Son défaut majeur est le manque total de spécificité. Elle sort si facilement de la cellule qu'on retrouvera des hypermyoglobinémies dans des myolyses non cardiaques comme pour la CK, la rhabdomyolyse, les myopathies et myodystrophies, l'exercice physique et la piqûre intramusculaire, mais encore les atteintes traumatiques, les brûlures, l'intoxication alcoolique. Dans le cadre cardiologique, la myoglobinémie (ce qui est aussi le cas, dans une moindre mesure, pour la CK et la CK-MB) augmente au cours de l'angor instable, dans des troubles du rythme, au cours des péricardites aiguës, des cardiomyopathies, de l'intoxication digitalique ou encore de la chirurgie cardiaque et des coronaires. Ainsi, les situations sont nombreuses où l'IDM, s'il n'est pas constitué, peut survenir brutalement, rendant les résultats de ces marqueurs bien difficilement interprétables.

## 5. Myosine et troponines

Le complexe troponine est situé sur le filament fin de l'appareil contractile myofibrillaire et régule la contraction du muscle en contrôlant l'interaction actine-myosine : la troponine T fixe le complexe au filament de tropomyosine, la troponine C permet la liaison du calcium, la troponine I inhibe la contraction en l'absence de calcium. Lors d'une nécrose ischémique, la lyse des cellules musculaires cardiaques provoque la libération de ces protéines dans la circulation. Seules les protéines présentant une isoforme cardiaque seront utilisables comme marqueur d'IDM. C'est le cas des chaînes lourde et légère de la myosine, des troponines T et I.
Des dosages immunoenzymatiques précis et sensibles ont été développés pour ces trois marqueurs. La myosine s'est rapidement avérée peu intéressante, surtout à cause de son grand délai d'élévation dû à une masse moléculaire élevée (quatre ou cinq jours après la douleur initiale). Son intérêt ne serait que rétrospectif et éventuellement quantitatif sur le volume infarci.
Les troponines T (TnT) et I (TnI) sont beaucoup plus intéressantes car il existe maintenant des isoformes cardiaques bien quantifiables dans des systèmes immunoenzymofluorimétriques utilisant des anticorps monoclonaux. Néanmoins, étant liées au complexe myofibrillaire, elles sortiront assez tardivement de la cellule, n'en faisant pas des marqueurs très précoces. Leur cinétique de libération est en fait assez proche de celle de la CK-MB, soit une élévation plasmatique moins rapide que pour la myoglobine mais plus rapide que pour la myosine ou encore l'ASAT et la LDH (*fig. 1*). Les deux atouts majeurs de ces marqueurs sont leur sensibilité et leur spécificité. Chez le sujet sain, la concentration de TnT cardiaque est inférieure à 0,5 ng/ml et la TnI cardiaque n'est quasiment pas décelable (< 0,05 ng/ml). La supériorité de la TnI sur la TnT réside dans sa cardiospécificité : c'est le seul marqueur actuel qui n'est pas synthétisé par les cellules musculaires non cardiaques et il n'y a pas de TnI musculaire dans le cœur. Ainsi, la TnI cardiaque ne s'élève pas au cours des accidents myolytiques aigus ou chroniques comme c'était le cas pour tous les autres marqueurs vus précédemment ou encore au cours de l'insuffisance rénale chronique, alors que la TnT cardiaque peut s'élever dans ce dernier cas, aussi parfois chez les patients atteints de maladie de Duchenne. Par ailleurs, la cinétique d'élévation de la TnT cardiaque est plus longue que celle de la TnI cardiaque.

### b) CK-MB

Quand la CK-MB était dosée enzymatiquement, on l'exprimait en fonction de la CK totale par un calcul d'index relatif (IR), soit :

$$IR = \frac{CK\text{-}MB(UI/l) \times 100}{CK\ totale(UI/l)}$$

Selon les méthodes utilisées, cet IR était normalement inférieur à 4 ou 5 %, le seuil décisionnel pouvait donc être défini au-delà. À l'avènement du dosage pondéral de la CK-MB, on a gardé l'expression (contestable) en fonction de la CK totale, soit :

$$IR = \frac{CK\text{-}MB(ng/ml) \times 100}{CK\ totale(UI/l)}$$

La spécificité cardiaque du dosage pondéral étant meilleure, l'IR a été abaissé à 3 ou 4 %, le seuil décisionnel pouvant se définir aussi au-delà, mieux encore si on y ajoute la valeur absolue de la CK-MB : IDM de certitude si IR > 4 % et CK-MB > 8 ng/ml, à la cardiospécificité près de la CK-MB – donc dans un contexte cardiologique strict (douleur et/ou signes à l'ECG et/ou autres enzymes augmentées).

### c) Troponines et myoglobine

En deçà de 50 ng/ml de myoglobine, on parlera d'un « seuil d'exclusion d'IDM » si la douleur initiale date de plus de trois heures. Au-delà de 90 ng/ml, le diagnostic d'IDM est probable si les autres causes d'élévation de la myoglobinémie peuvent être écartées. Au-delà de 130 ng/ml, la décision de thrombolyse pourrait être prise, bien sûr toujours dans un contexte de douleur thoracique caractéristique. Il n'y a donc pas de seuil de décision à proprement parler. Toute la valeur d'un dosage de la myoglobine ne s'exprimera que dans le cadre d'un arbre décisionnel alliant plusieurs marqueurs.

**Tableau 1.** Exemple d'élévation des marqueurs cardiaques (enzymatiques ou non) au cours d'un IDM caractéristique à l'ECG et à l'examen clinique (douleur à l'heure H, analyses répétées de 1 heure après la douleur, H + 1, à 24 heures, H + 24)

| | Valeurs de référence | H + 1 | H + 4 | H + 6 | H + 24 |
|---|---|---|---|---|---|
| ASAT | < 30 UI/L | 25 | 27 | 38 | 89 |
| ALAT | < 35 UI/L | 35 | 34 | 35 | 38 |
| CK | < 150 UI/L | 63 | 85 | 307 | 420 |
| CK-MB | < 8 ng/ml | 2,1 | 3,4 | 14,4 | 24,2 |
| CK-MB/CK | < 4 % | 3,3 | 4,0 | 4,7 | 5,8 |
| LDH | < 280 UI/L | 182 | 201 | 268 | 542 |
| Myoglobine | < 50 ng/ml | 44 | 84 | 180 | 121 |
| Troponine Ic | < 0,05 ng/ml* | < 0,05* | 0,5 | 7,5 | 6,5 |

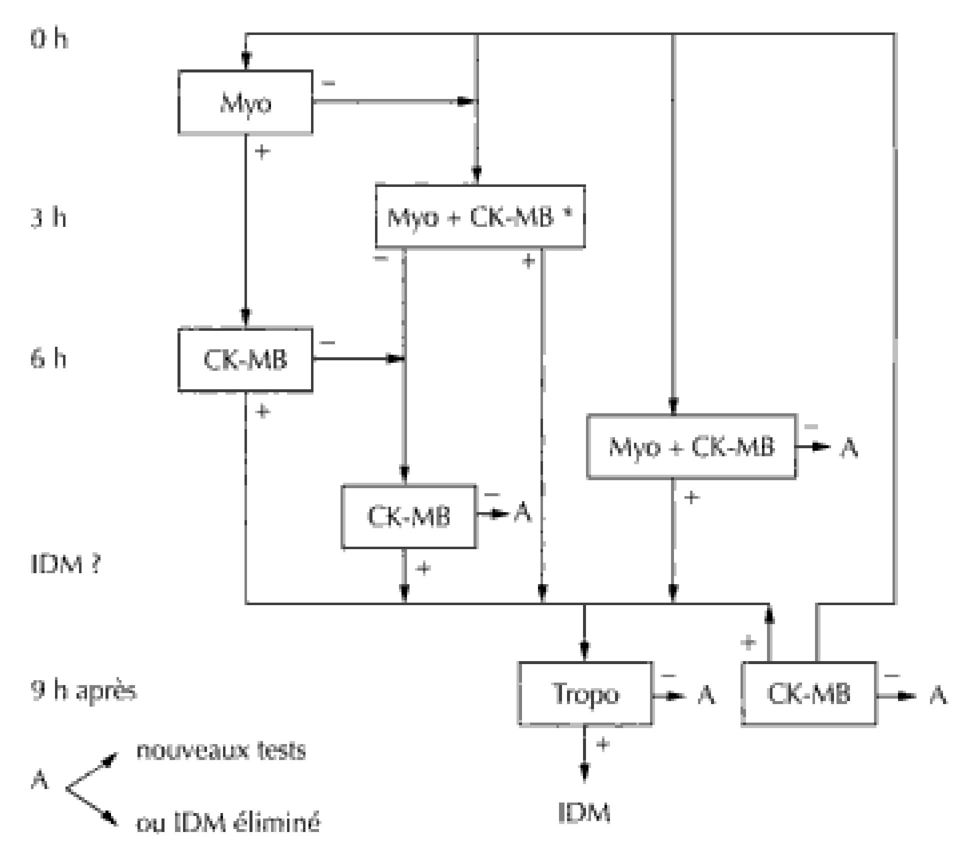
* Valeur de référence transmise à titre indicatif étant donné qu'aucune standardisation n'a encore été réalisée.

Pour les TnT et TnI cardiaques, le problème est tout autre : leur cardiospécificité est parfaite, en tout cas pour la TnI, mais leurs élévations sont peu précoces et, surtout, elles s'inscrivent dans le continuum qui va de la souffrance myocardique

à la nécrose caractérisant l'IDM. En particulier, la TnI cardiaque s'élèverait dès le stade d'angor instable, donc avant l'IDM sans onde Q et, bien sûr, avant l'IDM constitué (avec onde Q). La question reste entière sur un seuil décisionnel défini en fonction du seuil de sensibilité analytique qui, lui-même, diminue au fur et à mesure que les méthodes de dosage s'affinent. En corollaire, la TnI cardiaque s'intègre dans une stratification clinico-biologique du risque cardiaque, toute valeur au-dessus de la normale pouvant être interprétée comme un certain niveau (qualitatif ou quantitatif ?) de souffrance cardiaque. Par exemple, des concentrations anormalement élevées de TnI cardiaque peuvent être retrouvées dans les chocs hémorragiques, les chocs septiques et les contusions myocardiques montrant des dysfonctionnements cardiaques à l'origine d'une souffrance du myocarde et peut-être de lésions sous-endocardiques. Ces concentrations sont corrélées à la morbidité et à la mortalité tant cardiaque (consécutive à un IDM ou autre) que multiviscérale.

### d) Arbre décisionnel

Il associe plusieurs marqueurs cardiaques dans un contexte clinique évolutif. Il représente un compromis entre la précocité et la spécificité des marqueurs, vis-à-vis du cœur et vis-à-vis de l'IDM. Un exemple est donné *figure 2* avec l'option




* Indique que la CK-MB peut être remplacée par la troponine I cardiaque ramenant l'arbre à deux marqueurs, le diagnostic d'IDM étant effectué après au maximum 1 Myo et 2 Tropo.
L'arbre commence différemment selon le délai de prise en charge après les premières douleurs (en heures). Le signe « + » indique que la valeur du dosage est au-dessus du seuil décisionnel, le signe « – » qu'elle est en deçà. Le diagnostic d'IDM ou son élimination sera effectué après au maximum 1 Myo, 2 CK-MB et 1 Tropo.

**Figure 2.** Arbre décisionnel utilisant trois marqueurs : myoglobine (Myo), CK-MB et troponine I ou T cardiaque (Tropo)

d'une stratégie à deux ou à trois marqueurs. Notons qu'aujourd'hui, beaucoup d'automates d'immunochimie multiparamétrique proposent les dosages simultanés des trois marqueurs : CK-MB, TnI cardiaque et myoglobine. En France, les recommandations actuelles préconisent l'emploi d'une troponine pour réaliser le diagnostic d'IDM en permettant d'en doser une deuxième fois dans les six à douze heures après la douleur et si l'ECG est normal ou non diagnostiqué avec une première troponine inférieure au seuil de détection. La CK-MB massique peut être utilisée si un dosage de troponine n'est pas disponible. Dans le cadre du paradigme du SCA, l'absence de sus-décalage ST mais avec une troponine positive conduit à prescrire un traitement par anti-GPIIb-IIIa et une coronographie. Si la troponine reste normale après douze heures, une épreuve d'effort pourra être entreprise.

## D. Marqueurs en cours d'évaluation

### 1. Marqueurs cardiaques

Il ressort de cet exposé que le marqueur idéal d'IDM n'a pas encore été trouvé. De nouveaux marqueurs potentiels apparaissent régulièrement dans la littérature scientifique. C'est le cas du *B-type natriuretic peptide* (BNP), hormone cardiaque natriurétique et vasodilatatrice, synthétisée essentiellement dans les myocytes ventriculaires, et qui, à ce titre, est souvent un marqueur de souffrance ventriculaire. Son élévation plasmatique au cours de l'IDM est précoce et sensible. Sa cinétique bimodale pourrait refléter une insuffisance ventriculaire postinfarctus. La *fatty acid-binding protein* (FABP) semble être un facteur précoce de nécrose mais son dosage est encore difficile et son évaluation clinique n'est pas terminée.

### 2. Marqueurs de l'inflammation et du stress oxydant

L'IDM s'accompagne d'un syndrome inflammatoire systémique avec fièvre et hyperleucocytose à polynucléaires pendant environ deux semaines. La vitesse de sédimentation globulaire s'accélère en deux à cinq jours et s'accompagne d'une hyperfibrinémie. La protéine C-réactive (*C-reactive protein*) augmente, mais pas précocement. Une forte élévation serait de mauvais pronostic. Le *tumor necrosis factor*-α augmente aussi, probablement du fait de la migration de macrophages vers le site nécrotique cardiaque. Son intérêt pronostique est encore mal connu.
La phase de reperfusion postischémique est à l'origine d'un stress oxydant avec production de radicaux libres oxygénés et des produits finaux de lipoperoxydation comme le malonedialdéhyde (MDA), mesurable dans le plasma sanguin, ou encore l'albumine oxydée dont l'augmentation dans le plasma serait prédictive de SCA à six heures et 24 heures. De récentes études ont donné des valeurs pronostiques du même ordre pour la glutathion peroxydase et la myéloperoxydase. L'étude du stress oxydant et des protections antioxydantes permettrait d'expliquer la physiopathologie des lésions de reperfusion et d'explorer un éventuel effet des traitements antiradicalaires à la phase aiguë de l'IDM.

# III. Suivi biologique

## A. Quantification de la taille de l'infarctus

Cette quantification est un élément important de l'appréciation du risque après IDM puisqu'elle est directement corrélée à la mortalité. Les CK totale, CK-MB et isoLDH-1 sont de bons marqueurs quantitatifs puisqu'ils sont corrélés avec les données de l'anatomopathologie et de l'angiographie ventriculaire. Cela semble aussi le cas de la TnT cardiaque. Transaminases et myoglobine sont de mauvais marqueurs quantitatifs. La quantification de la taille de l'infarctus nécessite des dosages itératifs de façon à dresser une courbe cinétique qui réponde aux modèles, dérivés de la pharmacocinétique, mono- ou bicompartimentaux. Un logiciel informatique permet de déterminer la masse totale nécrosée avec la détermination des constantes de distribution et d'élimination du marqueur.

## B. Suivi de reperfusion après thrombolyse

L'administration précoce d'un traitement fibrinolytique à la phase aiguë de l'IDM permet d'en réduire la mortalité en levant thrombose et sténose. Toutefois, quel que soit le traitement utilisé, une perméabilité rapide des coronaires n'est pas toujours obtenue. Savoir juger de la qualité de la reperfusion présente un double intérêt, d'abord pronostique puisqu'elle limite la période d'ischémie, ensuite thérapeutique puisqu'on proposera une angioplastie de sauvetage en urgence devant un échec de la reperfusion. Pour juger de cette reperméabilisation, la méthode de référence est la coronarographie post-thrombolyse, méthode lourde, contraignante et finalement disponible sur très peu de sites. Les marqueurs biochimiques sont une solution simple. On jugera de la pente d'élévation de la concentration plasmatique du marqueur puisque la thrombolyse aura permis un relargage massif des protéines accumulées par la sténose et la thrombose. Après une thrombolyse réussie, on doit donc s'attendre à une brusque augmentation de la myoglobine, des troponines et même, très simplement, de la CK totale.

## C. Diagnostic rétrospectif d'IDM

Cette situation n'est pas fréquente mais peut avoir un intérêt pour dater un infarctus si celui-ci est constaté à distance de la crise. Les marqueurs utilisables seront ceux à demi-vie plasmatique prolongée, comme la LDH et les troponines.

## D. Exploration biologique du processus athéroscléreux

Elle va aider à replacer l'IDM dans le contexte d'athérosclérose généralisée et éventuellement à comprendre les processus mis en jeu. C'est donc un support essentiel des préventions secondaire et tertiaire qui associent des médicaments à des mesures hygiéno-diététiques strictes. C'est aussi l'exploration des facteurs de risque liés à l'athérosclérose qui permet de justifier une prévention.

Les dosages biochimiques sanguins permettent d'améliorer tant le diagnostic que le suivi évolutif et thérapeutique. Les enzymes signant la cytolyse cardiaque (ASAT, CK, LDH) perdent peu à peu de leur intérêt devant des marqueurs plus spécifiques (isoenzymes : CK-MB et CK-$MM_3$-$MM_1$ ; troponines : TnT et surtout TnI) ou plus précoces (myoglobine). Ces marqueurs présentent des cinétiques différentes permettant de les associer dans des profils et des arbres décisionnels, de suivre la reperfusion après thrombolyse et de poser un diagnostic d'IDM rétrospectivement. Certains peuvent servir à déterminer la masse totale nécrosée. CK-MB, troponines, myoglobine sont maintenant dosés par des méthodes immunoenzymatiques et souvent par des appareils adaptés aux situations d'urgence. Le marqueur idéal n'a pas encore été trouvé même si la TnI cardiaque (TnIc) semble s'en approcher. En particulier, l'existence et la valeur d'un seuil décisionnel restent ambiguës pour plusieurs de ces marqueurs dont la TnIc. Actuellement, on peut exclure temporairement le diagnostic d'IDM devant : myoglobine < 50 ng/ml, CK-MB < 8 ng/ml et CK-MB/CK totale < 3 %, TnIc < 0,05 ng/ml.
Enfin, étant donné que l'IDM survient dans un contexte d'athérosclérose généralisée, c'est l'exploration des facteurs de risque qui permettra de justifier une prévention secondaire. Le bilan lipidique et les marqueurs d'inflammation, ou encore de l'atteinte pariétale primitive, s'inscrivent dans ce contexte. Ils font aussi partie de l'exploration biologique postinfarctus ou de tout autre accident lié à l'athérosclérose (prévention tertiaire).

### *Pour en savoir plus*


- Abenschein D. R. Rapid diagnosis of myocardial infarction and reperfusion by assay of plasma isoforms of creatine kinase isoenzymes. *Clin Biochem* 1990 : 23 ; 399-407.
- Adams J. E., Bodor G. S., Davila-Roman V. G. *et al.* Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation* 1993 ; 88 : 101-6.
- Bhayana V., Henderson A. R. Biochemical markers of myocardial damage. *Clin Biochem* 1995 ; 28 : 1-29.
- Morrow D.A., Cannon C.P., Jesse R.L., et al. National Academy of clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines : clinical characterictics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. Clin. Chem. 2007 ; 53 : 552-74.
- Zabel M., Hohnloser S. H., Köster W. *et al.* Analysis of creatine kinase, CK-MB, myoglobin, and troponin T time-activity curves for early assessment of coronary artery reperfusion after intravenous thrombolysis. *Circulation* 1993 ; 87 : 1542-50.

# Hyperuricémies

J. MYARA
Laboratoire de biochimie appliquée, UFR de pharmacie Paris-XI.
Laboratoire de biochimie, Groupe hospitalier Charles Foix
– Jean Rostand, AP-HP, Ivry-sur-Seine.

*L'acide urique (trihydroxy-2,6,8-purine) est formé d'un noyau pyrimidine et d'un noyau imidazole. Il constitue chez l'homme le stade ultime du catabolisme des purines (bases puriques, nucléosides et nucléotides). L'acide urique est un constituant peu soluble dans l'eau. Une alcalinisation des liquides physiologiques favorise la formation d'urate plus soluble.*

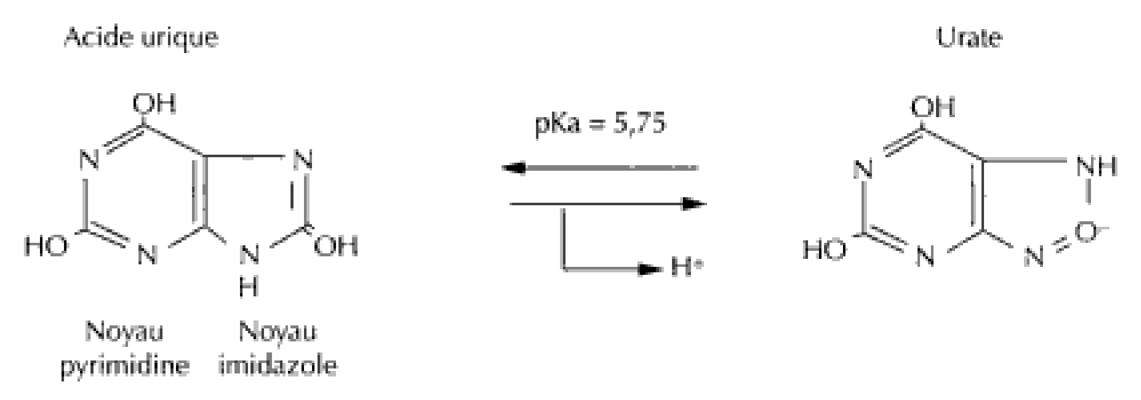



**Figure 1.** Structure de l'acide unique

*Les hyperuricémies résultent d'un défaut de production et/ou d'élimination rénale de l'acide urique et sont susceptibles de provoquer la goutte. Les hypo-uricémies, d'origine génétique et secondaire à certaines pathologies ou thérapeutiques, ne provoquent aucun trouble clinique spécifique. Leur exploration ne figure pas au programme du concours de l'internat en pharmacie.*

# I. Métabolisme de l'acide urique

## A. Origine des bases puriques chez l'homme

Les bases puriques proviennent :
- d'une biosynthèse endogène (purinosynthèse *de novo*) ;
- du catabolisme des acides nucléiques.

### 1. Purinosynthèse *de novo* (*fig.* 2)

Le noyau purique est surtout synthétisé au niveau hépatique à partir du $CO_2$, de certains acides aminés (acide aspartique, glycine et glutamine) et de groupements formyles.

*Première étape* : formation du PRPP (5-phosphoribosyl-α-1-pyrophosphate) à partir du ribose-5-phosphate et de l'ATP sous l'action de la PRPP synthétase.

*Deuxième étape* : formation de la 5-phosphate β-ribosyl-1-amine à partir de la fixation de la L-glutamine sur le PRPP sous l'action de l'amidophosphoribosyl transférase (amidotransférase). Cette étape est irréversible.

*Étapes suivantes* (une dizaine) : incorporation de différents constituants pour la formation du noyau purique. Ce noyau purique est toujours porteur du ribose-phosphate de départ. Un nucléotide (et non une base purique) se forme donc

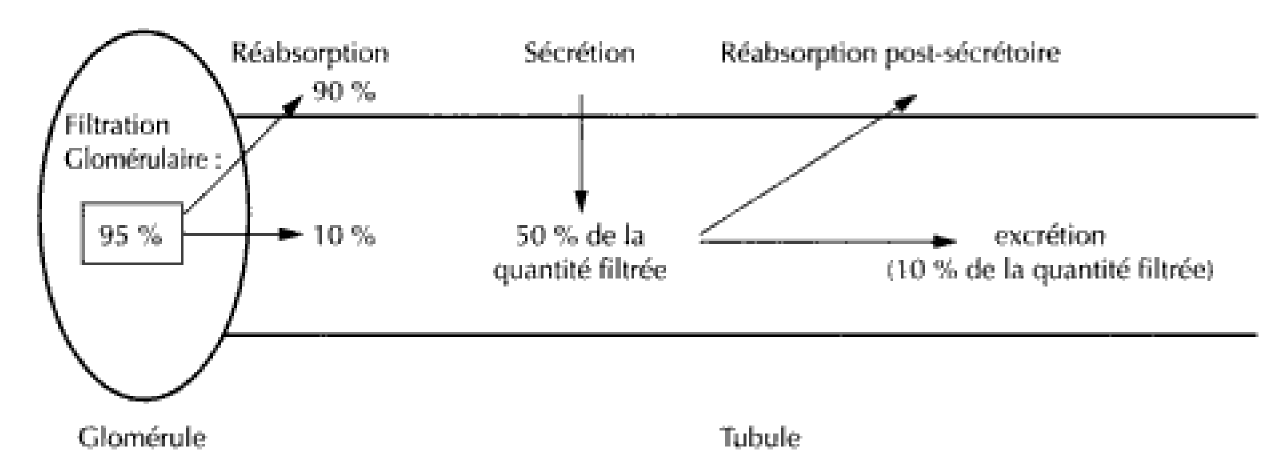



**Figure 3.** Élimination rénale de l'acide urique

*Filtration glomérulaire* : 95 % de l'acide urique plasmatique sont filtrés.
*Réabsorption tubulaire* : 90 % de l'acide urique filtré sont réabsorbés au niveau du tube contourné proximal (TCP) par un transporteur, URAT-1 (*urate transporter-1*), localisé sur la membrane apicale des cellules tubulaires proximales (*fig. 4*). Pour respecter l'électroneutralité, la réabsorption tubulaire de l'acide urique est couplée à l'élimination d'un autre anion (organique ou minéral) assurée par un cotransporteur $Na^+$-anions. Les anions organiques anti-uricosuriques tels que nicotinate, pyrazinoate, lactate, β-hydroxybutirate et acétoacétate, entrent en compétition avec les urates au niveau d'URAT-1. En outre, certains parmi eux jouent le rôle d'anions dans le cotransport $Na^+$-anions.
*Sécrétion tubulaire* : elle correspond à 50 % environ de la quantité filtrée. Elle est concomitante ou postérieure à la réabsorption.
*Réabsorption postsécrétoire* : elle concerne environ 80 % de la quantité sécrétée.
Au total, moins de 10 % de l'acide urique filtré sont retrouvés dans l'urine (la clairance de l'acide urique est dix fois plus faible que celle de la créatinine). Valeurs usuelles :

- uraturie : 2,4-4,8 mmol/24 h (0,4-0,8 g/24 h) ;
- clairance de l'acide urique : 6-11 ml/min chez l'homme. Elle est supérieure chez la femme non ménopausée car les œstrogènes stimulent l'excrétion urinaire de l'acide urique.

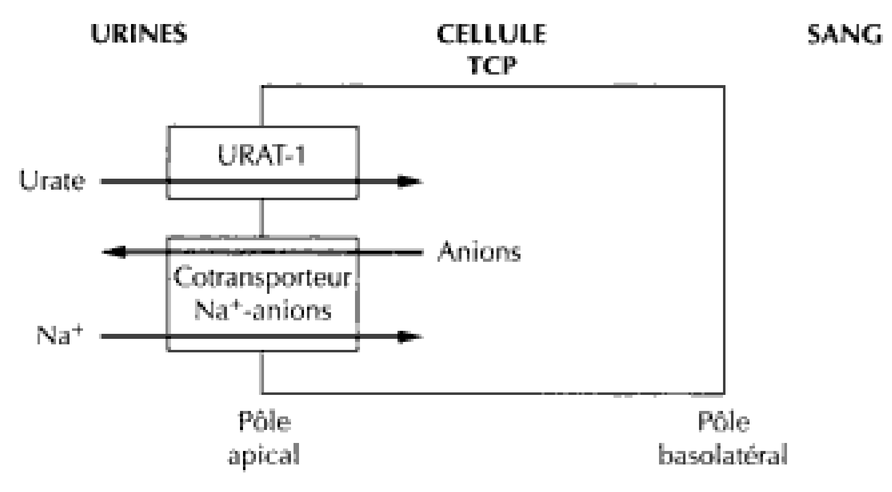



**Figure 4.** Réabsorption tubulaire de l'acide urique par la cellule tubulaire proximale

cristaux d'urate de sodium par les polynucléaires (qui larguent des enzymes lysosomiales) et les macrophages (qui libèrent des cytokines).

### 3. Biologie

*Uricémie* : elle peut être normale lors de la crise de goutte chez 30 % des patients. Mais tous les sujets goutteux ont déjà présenté ou présenteront une hyperuricémie. Toutes les hyperuricémies ne donnent pas une goutte (un tiers des sujets avec une uricémie > 540 μmol/L).
*Uraturie* : la détermination de l'uraturie permet le classement des goutteux en hypo-, normo- ou hyperexcréteurs.
*Évaluation du syndrome inflammatoire* : VS, protéines de l'inflammation, hyperleucocytose. Le syndrome inflammatoire est le plus souvent modéré.
*Liquide articulaire* : une ponction sera réalisée au niveau de l'articulation touchée si la localisation est atypique. L'examen microscopique du liquide met en évidence la présence de cristaux d'urate à bouts pointus, biréfringeants, intra- ou extracellulaires. Ils sont dissous par l'uricase contrairement aux autres cristaux.
*Déficit enzymatique* : la recherche d'un déficit enzymatique sera effectuée chez les patients présentant une crise de goutte aiguë avant l'âge de 30 ans.

## B. Goutte chronique

La goutte chronique devient une affection rare car le traitement proposé actuellement est efficace. Les principales complications d'une goutte chronique sont les suivantes :
- arthropathies ;
- tophus : dépôts d'urates sous la peau (oreille, coude, pieds) ;
- lithiases rénales (radiotransparentes). Elles sont présentes chez 20 à 40 % des patients goutteux et résultent de l'hyperuraturie et d'une hyperacidité (d'où l'intérêt de l'alcalinisation des urines). Les lithiases uriques peuvent apparaître chez des sujets hyperuricémiques en l'absence de goutte et chez des sujets avec une uricémie normale (20 % seulement des patients avec des lithiases uriques ont une hyperuricémie) ;
- néphropathie interstitielle chronique (protéinurie, HTA) qui évolue vers l'IRC.

L'hyperuricémie chronique est associée à une résistance à l'insuline et à des complications cardio-vasculaires.

## C. Traitement

### 1. Crise de goutte aiguë

*Colchicine* (poison du fuseau et antimitotique) : c'est le traitement de choix. La durée du traitement doit être d'au moins trois semaines (forte dose au début puis diminution rapide des doses). Les effets indésirables sont dominés par les diarrhées. Il faut y associer des antalgiques et un repos de l'articulation.
*Anti-inflammatoires non stéroïdiens* (AINS) : à prescrire uniquement s'il existe une contre-indication à la colchicine.
*Corticoïdes* : ils n'ont pas leur place dans le traitement de la crise de goutte aiguë.

### 2. Hyperuricémie chronique

*Régime pauvre en purines* : il faut éviter les aliments riches en purines (gibiers, abats, fruits de mer, caviar, etc.), supprimer les boissons alcoolisées, traiter le surpoids éventuellement et alcaliniser les urines (boissons alcalines).
*Médicaments hypo-uricémiants* : à donner à distance de la crise de goutte aiguë. L'allopurinol (Zyloric®), inhibiteur de la xanthine oxydase (*fig. 2*) est le plus utilisé. Les allergies cutanées constituent le principal effet indésirable de ce médicament.

### 3. Hyperuricémie aiguë

*Traitement par l'uricase* (utilisé lors des chimiothérapies par exemple) : l'allantoïne formée est cinq à dix fois plus soluble que l'acide urique.

## IV. Hyperuricémie et grossesse

Il faut surveiller l'uricémie chez les femmes enceintes hypertendues. Une hyperuricémie précède l'apparition des signes cliniques de la toxémie gravidique. Normalement, une baisse de 30 % de l'uricémie est observée au début de la grossesse, expliquée par une hémodilution et une augmentation de la clairance rénale. L'uricémie remonte ensuite à partir du troisième trimestre, avec l'augmentation de la réabsorption tubulaire et la production d'uricémie par le fœtus. Une uricémie ≥ 300-360 µmol/L signe une souffrance fœtale. L'accouchement sera déclenché dès la maturation pulmonaire. Si l'uricémie est supérieure à 600 µmol/L, la mort *in utero* est fortement probable. En fait, il est préférable de comparer les concentrations à celle du début de la grossesse. L'uricémie peut constituer un examen d'urgence chez la femme enceinte.

## Conclusion

Aucune innovation majeure n'a été apportée, ces dernières années, dans l'exploration des hyperuricémies. Au plan thérapeutique, la recherche de molécules agissant sur le transporteur URAT-1 et/ou sur le cotransporteur $Na^+$-anions pourrait fournir prochainement une nouvelle classe de médicaments hypo-uricémiants.

## L'essentiel de la question

L'acide urique constitue le stade ultime de la dégradation des purines. En raison de sa faible solubilité dans les liquides biologiques, toute augmentation de sa concentration aura pour conséquence une précipitation au niveau tissulaire (articulation, rein, peau). Le rein constitue la principale voie d'élimination de l'acide urique qui subit successivement une filtration glomérulaire, une réabsorption et une sécrétion tubulaire et, enfin, une réabsorption postsécrétoire. Au final, moins de 10 % de l'acide urique filtré sont retrouvés dans l'urine. Les hyperuricémies ont pour origine

un excès de production et/ou un défaut d'élimination rénale. Elles sont d'origines primitives ou secondaires. Les hyperuricémies résultant d'un excès de production (25 % des cas) s'accompagnent d'une hyperuraturie. Les origines primitives sont les plus fréquentes. Parmi les troubles du métabolisme, la maladie de Lesch-Nyhan correspond à un déficit total en une enzyme intervenant dans le métabolisme de l'acide urique : l'hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl transférase (HGPRT). Les causes secondaires sont dominées par les apports alimentaires en purines excessifs et les affections qui s'accompagnent d'une lyse cellulaire importante (leucémies, cancers, etc.). Les hyperuricémies ayant pour origine un défaut d'élimination rénale sont majoritaires (75 % des cas). Elles s'accompagnent d'une uraturie normale ou diminuée. Leur étiologie est dominée par l'insuffisance rénale chronique et la prise de médicaments, notamment diurétiques et salicylés. Les hyperuricémies n'entraînent pas toutes une crise de goutte aiguë (un tiers des sujets avec une uricémie > 540 µmol/L). Cette complication s'observe surtout chez les sujets dont l'hyperuricémie a pour origine un excès de production endogène primitif d'acide urique. La crise de goutte aiguë se caractérise par la précipitation de cristaux d'urate de sodium, à l'origine d'une inflammation, au niveau des articulations (surtout le gros orteil). En l'absence de traitement, une goutte chronique s'installe dont les complications sont les suivantes : arthropathies, tophus (dépôts d'acide urique sous la peau), lithiases rénales et néphropathie (protéinurie, hypertension artérielle) qui évolue vers une insuffisance rénale chronique. Une place particulière doit être réservée aux hyperuricémies de la femme enceinte hypertendue, marqueur précoce d'une toxémie gravidique. Dans ce cadre, l'uricémie est considérée comme un examen d'urgence.

### *Pour en savoir plus*


- Stryer. « titre contribution » in *Biochimie*, 4e éd. Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 1997 : 739-61.
- Davidson. « Médecine interne » in *La Goutte*. 18e éd., Maloine, 2002 : 831-5.
- Bertin P., Tréves R. Goutte. Épidémiologie, physiopathologie, diagnostic, évolution, traitement. *La Revue du praticien* 1995 ; 45 : 505-9.
- Choi H.K., Mount D.B., Reginato A.M. Pathogenesis of Gout. *Ann Intern Med* 2005 ; 143 : 499-516.
- Goutte et hyperuricémie. Medinfos : http://www.medinfos.com/principales/fichiers/pm-rhu-gouttehyper.shtml

# Pancréatites aiguës

J. MYARA
Laboratoire de biochimie appliquée, UFR de pharmacie Paris-XI.
Laboratoire de biochimie, Groupe hospitalier Charles Foix
– Jean Rostand, AP-HP, Ivry-sur-Seine.

*Les pancréatites aiguës (PA) sont des affections fréquentes (incidence : 0,2 ‰) qui se caractérisent par une activation des enzymes pancréatiques provoquant une autodigestion du pancréas. Elles constituent une urgence médicale. La biologie permet :*
- *d'établir le diagnostic de PA par la détermination en urgence des activités amylasique (sérum et urines) et lipasique (sérum) ;*
- *de prévoir les complications par l'établissement de scores pronostiques ;*
- *de rechercher l'étiologie ;*
- *de suivre l'efficacité de la thérapeutique et l'apparition des complications ;*
- *de détecter les séquelles.*

# I. Physiopathologie

## A. Activation enzymatique

Une grande majorité (80 %) des protéines présentes dans le liquide pancréatique possède une activité enzymatique. Deux groupes d'enzymes sont sécrétés par le pancréas :
- enzymes directement actives (amylase, lipase) ;
- proenzymes ou zymogènes (trypsinogène, chymotrypsinogène, proélastase, etc.) qui sont activées dans la lumière intestinale par une entérokinase. Pour éviter l'activation des proenzymes au sein même du tissu pancréatique, les acini sécrètent des inhibiteurs enzymatiques comme l'IPT (inhibiteur pancréatique de la trypsine).

Les PA se caractérisent par une activation enzymatique intrapancréatique à l'origine d'une autodigestion de la glande. Le rôle initiateur est attribué à la trypsine qui secondairement activerait les autres enzymes. Deux hypothèses sont avancées pour expliquer l'activation initiale de la trypsine :
- emballement de l'activation du trypsinogène dont l'origine reste inconnue ;
- insuffisance de protection de l'IPT résultant d'une mutation de la protéine.

Une phase de régénération (avec apparition d'une fibrose) suit l'autolyse de la glande.

## B. Métabolisme de l'alcool

Le pancréas est capable de métaboliser l'alcool en acétaldéhyde par une voie oxydative faisant intervenir trois systèmes enzymatiques, le cytochrome P-450-E1, l'alcool déshydrogénase et l'aldéhyde déshydrogénase. Une voie non oxydative existe également à l'origine de la formation d'esters éthyliques d'acides gras toxiques pour le pancréas.

# II. Aspects cliniques

## A. Signes cliniques

La douleur constitue le principal symptôme révélateur. Elle est épigastrique et le plus souvent intense. La douleur peut parfois être absente. Les autres signes cliniques (vomissements, tachycardie, fièvre) sont peu spécifiques.

## B. Classification

On distingue classiquement les PA œdémateuses (80 % des cas) et les PA nécrosantes – ou nécrotico-hémorragiques – (20 % des cas).

### 1. PA œdémateuses

Elles se caractérisent par une réaction inflammatoire modérée se traduisant par un œdème interstitiel du pancréas. La réaction inflammatoire régresse rapidement (un ou deux jours), le plus souvent sans complications.

### 2. PA nécrosantes

Elles se caractérisent par une mortalité importante (20 à 30 %) qui nécessite une prise en charge rapide par un service de réanimation. L'évolution se déroule en deux phases :

- Une *phase initiale* caractérisée par une inflammation locale, la libération de substances vasoactives et d'enzymes activées, l'activation du complément et la création d'un troisième secteur liée à la séquestration liquidienne péritonéale. Il en résulte :
  - un choc circulatoire (dû à l'hypovolémie et aux substances vasoactives) ;
  - des complications respiratoires mécaniques (hypoxémie) ;
  - des complications rénales (dues à l'hypovolémie et au choc circulatoire) ;
  - des troubles de la coagulation (CIVD) ;
  - des troubles métaboliques (hypoperfusion tissulaire et acidose lactique).

  Grâce aux progrès de la réanimation, la plupart des patients survivent à cette phase initiale.
- Une *phase secondaire* débutant vers la deuxième semaine et dominée par des complications :
  - locales : surinfections (responsables de 80 % des décès), abcès du pancréas, formation de « faux kystes du pancréas » (collection liquidienne dans les tissus extrapancréatiques environnants) ;
  - générales : défaillance d'organes (poumon, foie, rein) nécessitant à elle seule le transfert du patient dans un service de réanimation.

Au début de la maladie, il n'est pas possible de prédire la survenue des complications sur des arguments exclusivement cliniques. L'identification des formes sévères est importante car la prise en charge thérapeutique est différente, d'où l'intérêt de rechercher des paramètres pronostiques biologiques ou radiologiques prévoyant la survenue de ces complications.

## C. Étiologie

En France, la lithiase biliaire et l'alcoolisme représentent les deux causes principales de PA.

- *Lithiase biliaire* : 40 % des cas. La PA est la conséquence de l'obstruction du canal pancréatique après migration du calcul. Environ 15 % des microlithiases vésiculaires se compliquent d'une PA.
- *Alcoolisme* : 40 % des cas. Comme indiqué précédemment, le métabolisme pancréatique de l'alcool aboutit à la formation de dérivés toxiques. La PA est en général secondaire à une ingestion massive et aiguë d'alcool.

- *Autres causes* : 10 % des cas :
  - *traumatismes* et *suites postopératoires* (moins de 1,5 % de l'ensemble des PA) ;
  - hypercalcémies ;
  - *hypertriglycéridémies* ;
  - *médicaments* : acide valproïque, antirétroviraux, azathioprine, cimétidine, énalapril, estrogènes, FK506, furosémide, isoniazide, méthyl-dopa, métronidazole, paracétamol, rifampicine, sulfamides, tétracyclines, thiazidiques, etc. ;
  - *infections virales* (CMV), bactériennes ou parasitaires ;
  - *maladies auto-immunes* (LED, etc.) ;
  - *tumeurs* ;
  - anomalies congénitales pancréatiques.
- *Aucune cause retrouvée* : 10 % des cas. Une origine génétique est à envisager (mutations sur le gène du trypsinogène, de l'inhibiteur pancréatique de la trypsine, etc.).

### D. Thérapeutique

Il n'existe aucun traitement spécifique. Le traitement symptomatique consiste en la mise au repos du tube digestif (arrêt des apports alimentaires par voie orale), contrôle de la douleur et une équilibration hydro-électrolytique et acido-basique.

### E. Séquelles

Le diabète et l'insuffisance pancréatique exocrine sont les deux séquelles majeures susceptibles de survenir à la suite d'une pancréatite aiguë.

## III. Marqueurs diagnostiques : amylase, lipase

L'*amylasémie*, l'*amylasurie* et la *lipasémie* sont classiquement prescrites dans le cadre de l'exploration d'une symptomatologie douloureuse abdominale pour aider au diagnostic de PA.

### A. Propriétés physicochimiques

**Tableau 1.** Propriétés physicochimiques de l'amylase et de la lipase

| | Amylase<br>$\alpha$-1,4-glucan-4-glucanohydrolase (E.C. 3.2.1.1) | Lipase<br>Triacylglycerol acylhydrolase (E.C. 3.1.1.3) |
|---|---|---|
| Masse moléculaire | ≃ 50.000 | ≃ 50.000 |
| pH optimum | 7,0 | 7,4 – 10,0 |
| Substrats naturels | Amidon (liaison $\alpha$-1,4) | Triglycérides |
| Activateurs | Chlorures | Colipase<br>Acides biliaires<br>Calcium |
| Isoformes plasmatiques | Type pancréatique (type P) : 40 %<br>Type extrapancréatique (salivaire) (type S) : 60 % | ≥ deux isoformes |

## B. Localisation tissulaire

**Tableau 2.** Principales localisations tissulaires des amylases et de la lipase

| Amylasetype P (pancréatique) | Amylase type S (salivaire) | Lipase |
|---|---|---|
| Pancréas | Glandes salivaires<br>Poumon<br>Ovaires<br>Tumeurs | Pancréas*<br>Tractus digestif |

* Activité cinq fois supérieure à celle de l'amylase.

## C. Variations pathologiques

**Tableau 3.** Principales variations pathologiques de l'amylasémie et de la lipasémie

| | **Amylasémie** | **Lipasémie** |
|---|---|---|
| Pancréatite aiguë | ↗ ou ↗↗ (type P) | ↗ ou ↗↗ |
| Macroamylasémie | ↗ (Type P ou S) | N |
| Pathologies abdominales :<br>– troubles hépatobiliaires<br>– ulcère, occlusion intestinale<br>– infarctus mésentérique<br>– appendicite aiguë | N ou ↗ (Type P ou S) | N ou ↗ |
| Insuffisances rénales | ↗ (types P et S) | ↗ |
| Chirurgie cardiaque | N ou ↗ (type S) | N |
| Oreillons | ↗ (type S) | N |
| Cancer ovarien | ↗ (type S) | N |
| Cancer bronchique | ↗ (type S) | N |
| Acidocétose diabétique | ↗ (types S et P)<br>(dans 50 % des cas) | ↗ |

**Tableau 4.** Macroamylase

- Une macroamylase est constituée par l'association d'une macromolécule (immunoglobulines, en particulier) et d'une amylase (de type S ou P).
- La présence d'une macroamylase dans le sérum n'est pas pathologique.
- Du fait d'une masse moléculaire importante, le complexe n'est pas éliminé par le rein et s'accumule dans le plasma.
- Le diagnostic de macroamylase est évoqué par l'association hyperamylasémie + amylasurie normale, et confirmé par électrophorèse, filtration sur gel ou précipitation par le PEG.
- Les macrolipases sont exceptionnelles.

**Tableau 5.** Principales situations diagnostiques

| Amylasémie N<br>Lipasémie N | Amylasémie ↗↗<br>Lipasémie ↗↗ | Amylasémie ↗<br>Lipasémie N | Amylasémie ↗<br>Lipasémie ↗ | Amylasémie N<br>Lipasémie ↗ |
|---|---|---|---|---|
| Exclusion d'une PA | PA | – Macroamylase<br>– Origine extrapancréatique | – Pancréatite aiguë<br>– Origine digestive<br>– Insuffisance rénale | Diagnostic tardif d'une PA ? |

# Conclusion

Les activités amylasique et lipasique sont indispensables pour le diagnostic de PA, mais n'ont pas de valeur pronostique. La recherche de nouveaux marqueurs permettant de prévoir l'apparition des complications doit se poursuivre.

# L'essentiel de la question

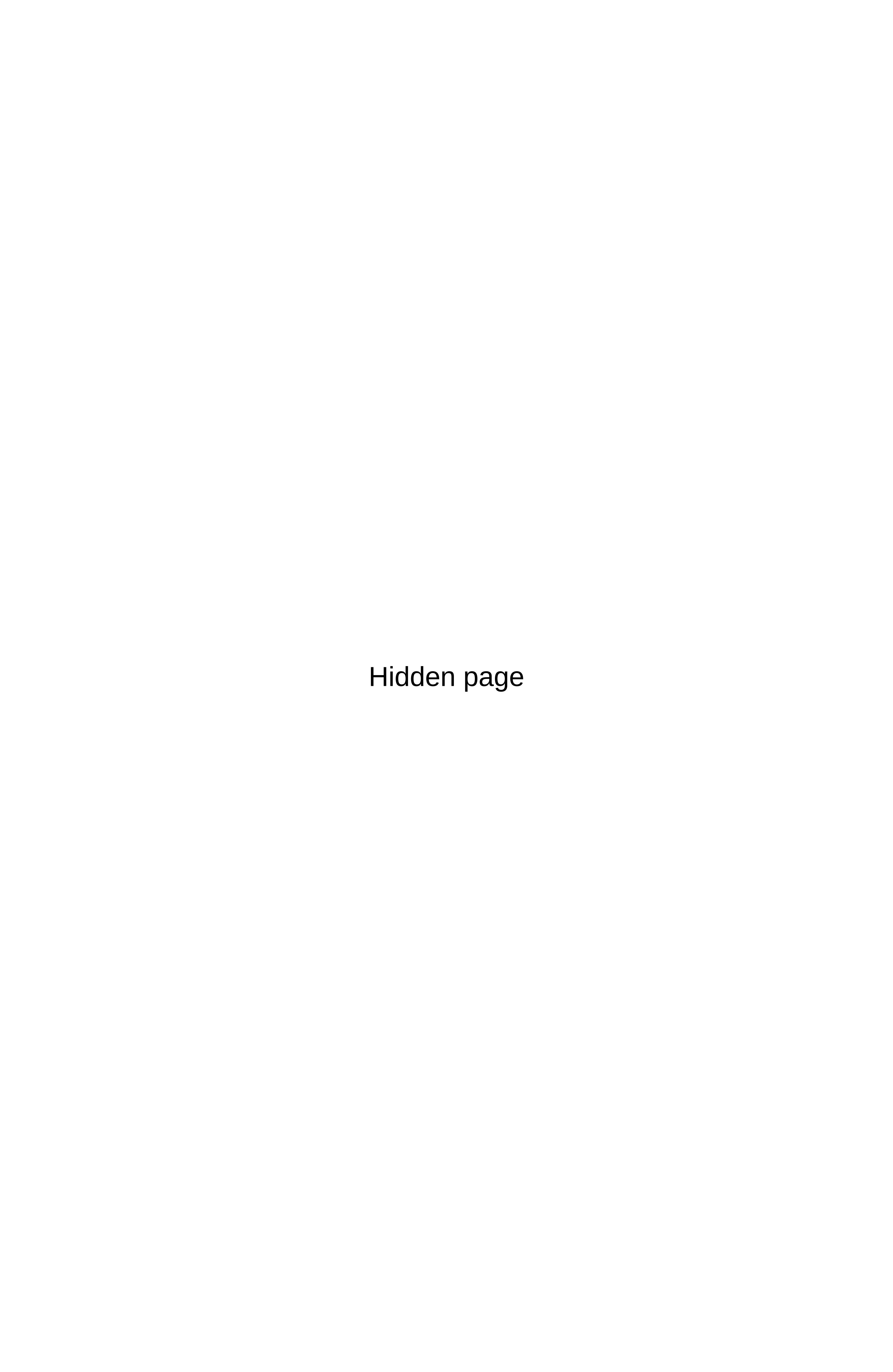
La pancréatite aiguë (PA), caractérisée par une douleur intense, constitue une urgence médicale. La PA résulte d'une activation enzymatique intrapancréatique à l'origine de l'autodigestion de la glande. Au plan étiologique, une lithiase biliaire ou une intoxication alcoolique sont retrouvées dans 80 % des cas. Le diagnostic de PA est réalisé en urgence par la détermination de l'amylasémie et de la lipasémie. Dans les PA typiques, l'amylasémie s'élève dès la troisième heure et demeure élevée environ quatre jours. La lipasémie est plus spécifique d'une atteinte pancréatique, son élévation est plus importante et se normalise plus tardivement (huit à quatorze jours). Une élévation modérée de l'une ou l'autre de ces activités enzymatiques s'observe dans de nombreux troubles d'origine extrapancréatique : macroamylase, atteintes des glandes salivaires, tumeurs du poumon et de l'ovaire, insuffisance rénale, acidocétose, etc. Dans ces circonstances, la détermination de l'amylasurie et des isoenzymes de l'amylase (type P et S) peuvent aider au diagnostic différentiel. Dans les PA, l'amylasémie et la lipasémie n'ont pas de valeur pronostique. L'évolution défavorable d'une PA est évaluée par le score de Ranson calculé en utilisant onze paramètres biocliniques : âge, leucocytes, glycémie, LDH, ASAT, calcémie, hématocrite, $PaO_2$, bicarbonates, urée plasmatique et volume de la séquestration liquidienne. Le biologiste intervient également dans la recherche étiologique (bilan hépatique, marqueurs de l'alcoolisme, calcémie, bilan lipidique et examens bactériologiques, viraux et parasitaires), le suivi thérapeutique (équilibration hydro-électrolytique et acido-basique) et dans la détection des complications (défaillance d'organes, infections) et des séquelles (diabète et insuffisance pancréatique exocrine).

### *Pour en savoir plus*


- Monzy F., Bommelaer G. Pancréatite aiguë. *La Revue du praticien*, 2005 ; 55 : 1841-7.
- Trinin F., Courillon F. « Les Biomarqueurs des pancréatites aiguës » in *Thesaurus de biologie clinique 2003*. FM/BIO : 62-88.
- Pancréatite aiguë. Conférence de consensus (Société française d'anesthésie-réanimation). ANAES 2001.

# Réactions inflammatoires : physiopathologie et exploration

M. BERNARD, Fédération de biochimie, Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, AP-HP, Paris.



*Les médiateurs néosynthétisés* proviennent de l'activation de différents systèmes enzymatiques :
- activation du système phospholipase A2, cyclo-oxygénase et lipo-oxygénase conduisant à la formation de médiateurs lipidiques qui vont entretenir vasodilatation, adhérence et migration cellulaire ;
- les PN et les macrophages utilisent deux systèmes de défense, l'un dépendant de l'oxygène (la NADPH oxydase), l'autre indépendant (la NO synthase) :
  – au cours de la réaction inflammatoire, les PN et les macrophages produisent une forte quantité de radicaux libres oxygénés (RLO) après activation d'une enzyme membranaire spécifique, la NADPH oxydase, par les cytokines pro-inflammatoires. Cette enzyme catalyse la production d'anions superoxydes qui, en présence de fer et de peroxyde d'hydrogène, conduit à la formation d'un radical plus toxique, le radical hydroxyl ($OH^-$) – réaction de Fenton. Si ces radicaux possèdent une activité bactéricide bénéfique, leur grande cytotoxicité rend nécessaire une détoxification rapide. En effet, un excès de production de RLO déborde les systèmes antioxydants de l'organisme et induit des dommages cellulaires importants,
  – les monocytes et les PN possèdent une enzyme particulière, la NO synthétase. Inductible par les cytokines pro-inflammatoires, elle conduit à la formation d'oxyde nitrique (NO).

### 2. Au plan systémique (*fig. 4*)

Différentes réponses sont observées à distance du foyer inflammatoire par le biais de trois cytokines produites par les monocytes-macrophages IL-1, IL-6 et TNFα. Les plus typiques sont :
- au niveau du foie, augmentation de la synthèse des protéines de l'inflammation (CRP, etc.) ;
- au niveau de la moelle osseuse, le GM-CSF induit la différenciation et la libération des PN ;
- au niveau de l'hypothalamus, stimulation des centres de la thermorégulation sous l'action de l'IL-1, du TNFα et de prostaglandine E2 (PGE2) ;
- au niveau hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien, IL-1 et TNFα entraînent la production de glucocorticoïdes.

## D. Phase de stabilisation

Pour éviter la prolongation des phénomènes inflammatoires qui auraient des conséquences graves, l'organisme met en œuvre une série de mécanismes visant à ralentir, puis à faire disparaître la réaction inflammatoire et ses effets. Cela se traduit par :
- une désactivation ou inhibition des médiateurs libérés au cours de l'inflammation ;
- une désactivation cellulaire et un blocage des systèmes humoraux.

D'autres protéases libérées au cours du déroulement de l'inflammation doivent également voir leur activité bloquée. Ces protéases, qui se répartissent en plusieurs catégories selon le site sur lequel elles agissent (sérines protéases, cystéines protéases et métalloprotéases), possèdent des inhibiteurs spécialisés.

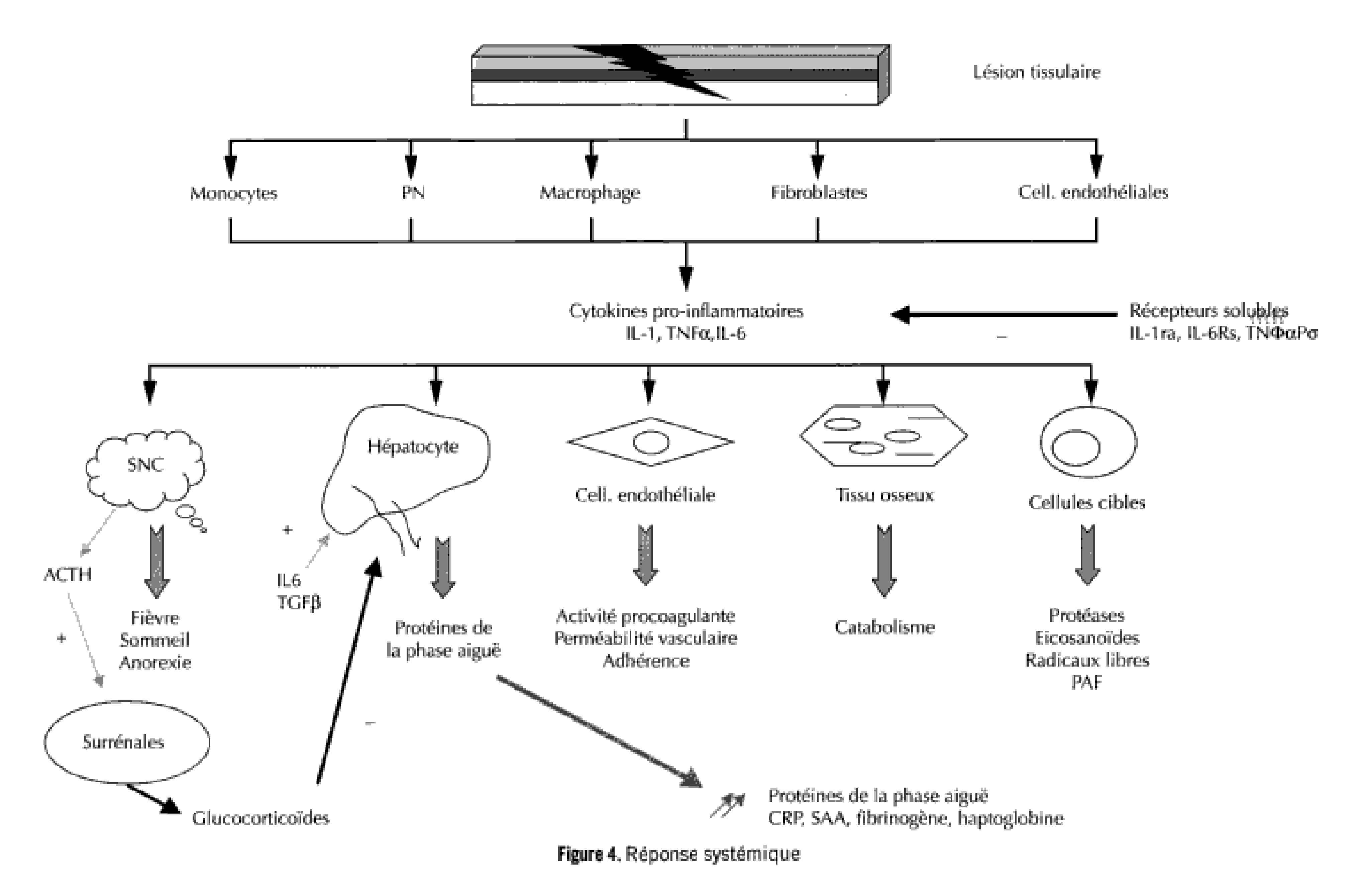
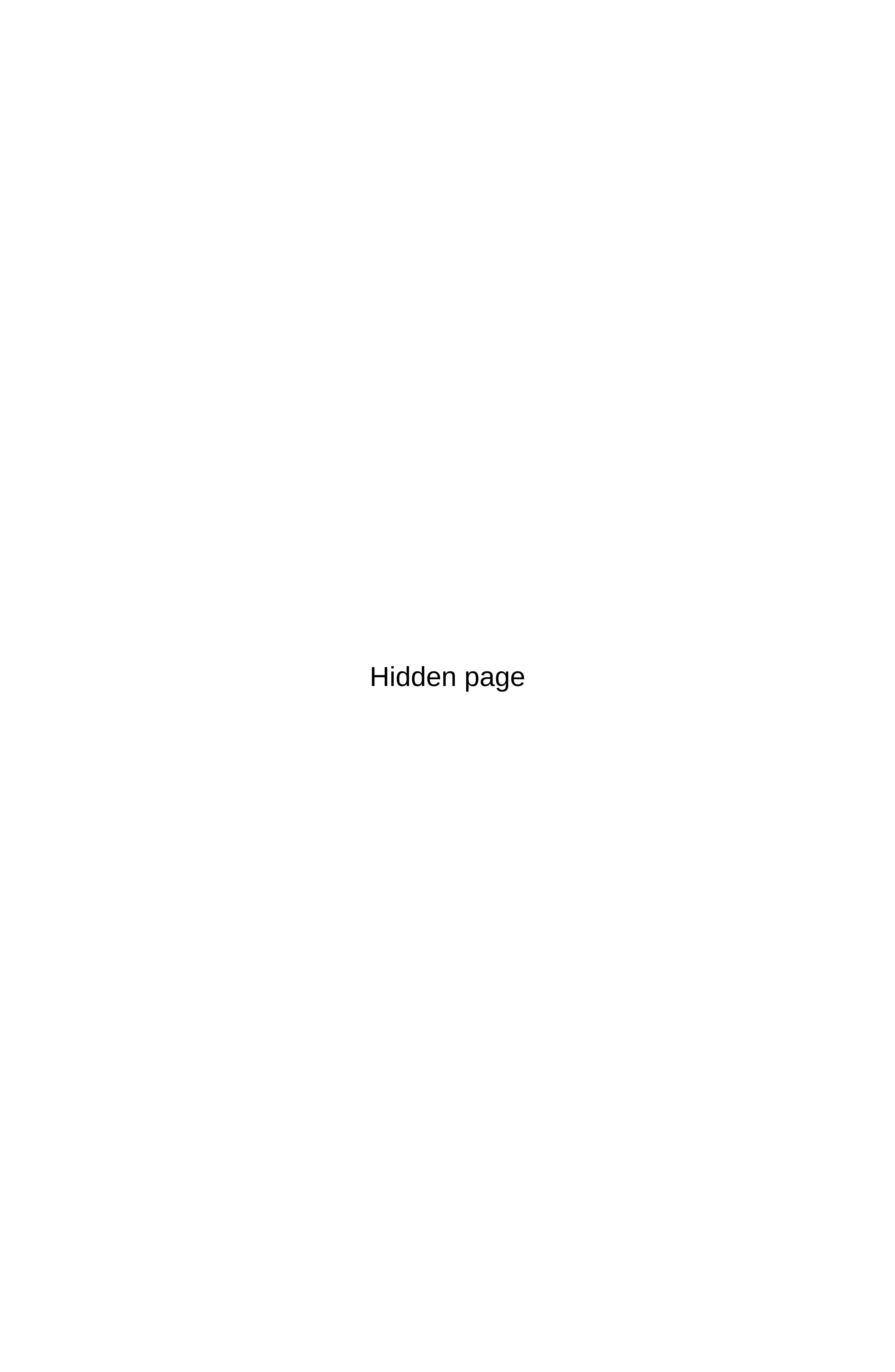



**Figure 4.** Réponse systémique


Hidden page

Actuellement, l'immunonéphélémétrie et l'immunoturbidimétrie sont les techniques de dosage les plus couramment utilisées. Très récemment, le dosage de la CRP a bénéficié d'une avancée technologique ouvrant un nouveau champ d'application à la détermination de cette protéine. Le dosage immunonéphélémétrique de la CRP utilisant un anticorps polyclonal a un seuil de sensibilité de 5-10 mg/L jugé suffisant pour le caractère décisionnel de la CRP dans les états inflammatoires. La mise au point d'un anticorps monoclonal a abaissé la sensibilité du dosage de la CRP à 0,02 mg/L (dosage ultrasensible de la CRP ou CRPus). Grâce à cette avancée technologique, le dosage de la CRP peut révéler ainsi une réaction inflammatoire *a minima*. Par son activité de complément et de stimulation de la production du facteur tissulaire, la détermination de la CRP pourrait évaluer l'importance de la composante inflammatoire au cours de l'athérosclérose. En effet, des études récentes ont montré l'existence d'un lien entre une concentration élevée en CRP et l'appartenance à un groupe à haut risque cardiovasculaire.

### C. Le profil protéique

Au cours de l'inflammation et surtout de la forme chronique, la coexistence possible de plusieurs mécanismes pathologiques rend difficilement interprétable le dosage d'une protéine isolée. Sa signification clinique sera mieux comprise qu'après comparaison avec différents marqueurs. Le concept de profil protéique trouve ainsi tout son intérêt dans l'aide au diagnostic et au suivi de l'évolution clinique. Il est la représentation graphique de la concentration de plusieurs protéines exprimée en pourcentages selon une médiane de valeurs de référence établie selon l'âge et le sexe. Une association sciemment choisie et une étude des corrélations ou des dissociations entre protéines permettent de déterminer l'ancienneté du processus inflammatoire et l'existence de processus physiopathologiques pouvant s'y ajouter.

## Conclusion

Près d'un tiers des patients consultants ou hospitalisés présente un état inflammatoire. Finalité d'un ensemble de mécanismes complexes de défense de l'organisme contre diverses agressions, l'inflammation peut être la cause ou la complication d'une pathologie. L'étude des mécanismes cellulaires et biochimiques mis en jeu permet actuellement de définir de nouveaux paramètres de diagnostic d'un état inflammatoire à un stade soit précoce soit *a minima*. Par ailleurs, certains d'entre eux peuvent conduire à un diagnostic différentiel.

L'exploration d'un syndrome inflammatoire repose sur la quantification de différentes protéines (cytokines et protéines de la phase aiguë). Actuellement, l'immunonéphélémétrie et l'immunoturbidimétrie sont les techniques de dosage les plus couramment utilisées. Mais la coexistence possible de plusieurs mécanismes pathologiques rend difficilement interprétable le dosage d'une protéine isolée. Le dosage simultané d'une protéine à cinétique rapide comme la protéine C-réactive (CRP) et d'une ou deux protéines à cinétique d'évolution lente comme l'haptoglobine et l'orosomucoïde permet de définir le profil protéique inflammatoire ciblé indispensable au clinicien pour le diagnostic et le suivi de l'évolution clinique.

### *Pour en savoir plus*


- Giraudet P., Faure A., Frot J.-C. *La réaction inflammatoire. Physiopathologie et exploration clinique*. Paris, Vigot, 1984.
- Russo-Marie F., Peltier A., Polla B. *L'inflammation*. Montrouge, John Libbey Eurotext, 1997.
- Borel J.-P., Maquart F.-X., Gillery Ph., Exposito M. *Biochimie pour le clinicien : mécanismes moléculaires et chimiques à l'origine des maladies*. Paris, Frison-Roche, 1999.

# Diagnostic immunologique de la grossesse

J. GUÉCHOT, Laboratoire d'hormonologie, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris.

*La gonadotrophine chorionique ou HCG (human chorionic gonadotrophin) est une hormone glycoprotéine produite par les cellules trophoblastiques dès la nidation de l'ovule fécondé dans la paroi utérine. L'apparition précoce de l'HCG dans le plasma et son élimination urinaire en font le marqueur biologique spécifique de la grossesse. La très grande spécificité des anticorps utilisés aujourd'hui permet de disposer de tests immunologiques fiables très précocement pour la recherche ou le dosage de l'HCG.*

# I. L'HCG

## A. Structure

L'HCG est une glycoprotéine comportant environ 30 % de glucides. Son point isoélectrique est 4,5 et sa masse moléculaire 36 700 Da. Sa structure est dimérique, constituée de deux sous-unités liées de manière non covalente.
La sous-unité α (masse moléculaire 14 500 Da), non spécifique de l'HCG, est presque similaire à celles de trois hormones hypophysaires (TSH, FSH et LH). Elle est constituée d'une séquence identique de 92 acides aminés comportant cinq ponts disulfure et deux chaînes oligosaccharidiques.
La sous-unité β (masse moléculaire 22 200 Da) est à l'origine de la spécificité de l'HCG. Sa structure présente cependant des homologies importantes avec celles des autres glycoprotéines hypophysaires, en particulier avec la sous-unité β de la LH (82 % d'homologie). La sous-unité β de l'HCG est constituée de 145 acides aminés comportant six ponts disulfure. Une séquence de 24 acides aminés dans sa partie carboxyterminale, absente sur la sous-unité β des hormones hypophysaires, est spécifique de l'hormone. Une liaison peptidique peut être rompue, le plus souvent en 47-48, parfois en 43-44 ou 44-45 : on parle d'HCG clivée, laquelle est inactive. La sous-unité β possède six chaînes glucidiques dont quatre dans la partie carboxyterminale.
La sous-unité α est codée par un gène unique alors que la sous-unité β est le produit d'au moins six gènes et pseudogènes. L'expression de ces gènes conduit à la production, soit de sous-unités α-HCG ou β-HCG libres, soit de l'hormone dimérique constituée d'une sous-unité α et d'une sous-unité β. La sous-unité α est produite en excès et la synthèse de la sous-unité β constitue l'étape limitante de la production de l'hormone active.

## B. Rôle physiologique

L'HCG est la première hormone produite en quantité appréciable par le trophoblaste. Elle est retrouvée fixée à la surface externe des membranes des cellules trophoblastiques, très précocement au cours des processus de différentiation. Elle est supposée avoir un rôle immunoprotecteur, évitant le rejet du blastocyte et facilitant la nidation. L'HCG exerce un contrôle sur les synthèses des hormones placentaires en stimulant la production des estrogènes. L'HCG stimule le corps jaune pendant les premières semaines de la grossesse pour maintenir la production d'hormones stéroïdiennes. Elle empêche la dégénération du corps jaune et stimule la production de progestérone par les cellules lutéales.
L'HCG possède probablement d'autres activités biologiques, mais son rôle physiologique est encore mal élucidé.

Il n'y a pas lieu de demander une recherche systématique d'HCG si la grossesse est suffisamment évoluée pour être diagnostiquée cliniquement ou si elle a été affirmée par l'échographie.
Il n'y a pas lieu de demander un dosage plasmatique quantitatif d'HCG pour déterminer la date précise de la fécondation.

* Les facteurs de risque de GEU sont les antécédents de pathologie inflammatoire pelvienne, la séropositivité à Chlamydiae trachomatis, un antécédent de grossesse extra-utérine, la chirurgie tubaire, le tabagisme (< 20 cigarettes/jour), une grossesse induite, une grossesse débutant sous contraception.

***Pour en savoir plus***


- Bellet D., Ozturk M., Fernandez H. *et al.* Intérêt clinique des dosages ultrasensibles et totalement spécifiques de l'hormone chorionique gonadotrope et de sa sous-unité bêta libre. *Rev. Prat* 1990 ; 40 : 1677-81.
- Cole L. A. Immunoassay of human chorionic gonadotropin, its free subunits, and metabolites. *Clin Chem* 1997 ; 43 : 2233-43.
- Graczykowski J. W., Seifer D. B. Diagnosis of acute and persistent ectopic pregnancy. *Clin Obstet Gyn* 1999 ; 42 : 9-22.
- O'Connor J. F., Birken S., Lustbader J. W. *et al.* Recent advances in the chemistry and immunochemistry of human chorionic gonadotropin : impact on clinical measurements. *Endocr Rev* 1994 ; 15 : 650-83.
- Rotmensch S., Cole A. False diagnosis and needless therapy of presumed malignant disease in women with false-positive human chorionic gonadotropin concentrations. *Lancet*, 2000 ; i : 712-5.

# Dysfonctionnements corticosurrénaliens

PH. BOUDOU, Service de biologie hormonale, Hôpital Saint-Louis, AP-HP, Paris.
J. GUÉCHOT, Service de Biochimie A, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris. (révision 2007).

*La corticosurrénale sécrète des hormones stéroïdes (fig. 1) réparties en quatre groupes :*

- *les glucocorticoïdes, représentés principalement par le cortisol et intervenant dans la régulation du métabolisme glucido-protidique et, à un degré moindre, sur l'équilibre électrolytique ;*
- *les minéralocorticoïdes sont représentés par l'aldostérone, exclusivement produite dans la zone glomérulée, la désoxycorticostérone (DOC) et la 18-hydroxycorticostérone (18OHB), qui peuvent également être synthétisées au niveau des zones fasciculées et réticulées agissent sur l'équilibre ionique ;*
- *les androgènes : la surrénale secrète des androgènes, dont l'essentiel est représenté par les stéroïdes en C19 (Δ4-androstènedione, déhydroépiandrostérone – DHEA –, et sulfate de DHEA), peu actifs, et précurseurs de la 11β-hydroxy-Δ4-androstènedione ;*
- *le cortex surrénalien normal secrète peu d'estrogènes (essentiellement de l'estrone).*

# I. Contrôle de la sécrétion surrénalienne

La sécrétion corticosurrénalienne est soumise à l'action de l'ACTH (*adrenocorticotropic hormone* ou corticotrophine) hypophysaire, elle-même contrôlée par la corticolibérine (*corticotrophin-releasing factor*) d'origine hypothalamique. La sécrétion de corticolibérine est soumise à un système de rétrocontrôle lié aux concentrations de cortisol circulant (*fig. 2*). C'est cet axe qui engendre le cycle nycthéméral de la sécrétion ACTH-cortisol et qui permet les réponses de la fonction corticotrope aux modifications du milieu intérieur et de l'environnement (réponse aux stress). Cette réponse au stress semble indépendante du cycle nycthéméral des corticoïdes.

L'ACTH a un effet stimulant faible sur le taux de sécrétion de l'aldostérone qui ne prend une importance réelle qu'en cas de stress. Le taux de sécrétion de l'aldostérone, qui dépend partiellement du taux de potassium, est essentiellement sous la dépendance du système rénine-angiotensine dans les circonstances normales.

L'activité de ce système est étroitement liée au volume plasmatique circulant, au pool sodé et aux perturbations du flux plasmatique.

Tous ces stéroïdes peuvent être produits en excès (syndrome de Cushing entre autre) ou insuffisamment (insuffisances surrénaliennes). Il s'en suit que tout excès ou insuffisance de sécrétion se traduit d'une manière plus ou moins importante sur les métabolismes précédemment décrits. L'exploration physiopathologique est indispensable pour l'établissement du diagnostic et la conduite du traitement.

Au sein des dysfonctionnements, nous envisagerons les hyper- et les hypofonctionnements corticosurrénaliens primitifs ou secondaires à une sollicitation extra-surrénale et dont la nature est d'origine strictement surrénalienne (périphérique) ou consécutive à une altération de la commande hypothalamo-hypophysaire. Nous ne traiterons pas les hyper- ou hypocorticismes d'origine iatrogène.

La classification est fondée sur le type des anomalies sécrétoires : nature des hormones en défaut ou en excès, le processus physiopathologique et anatomique en cause.

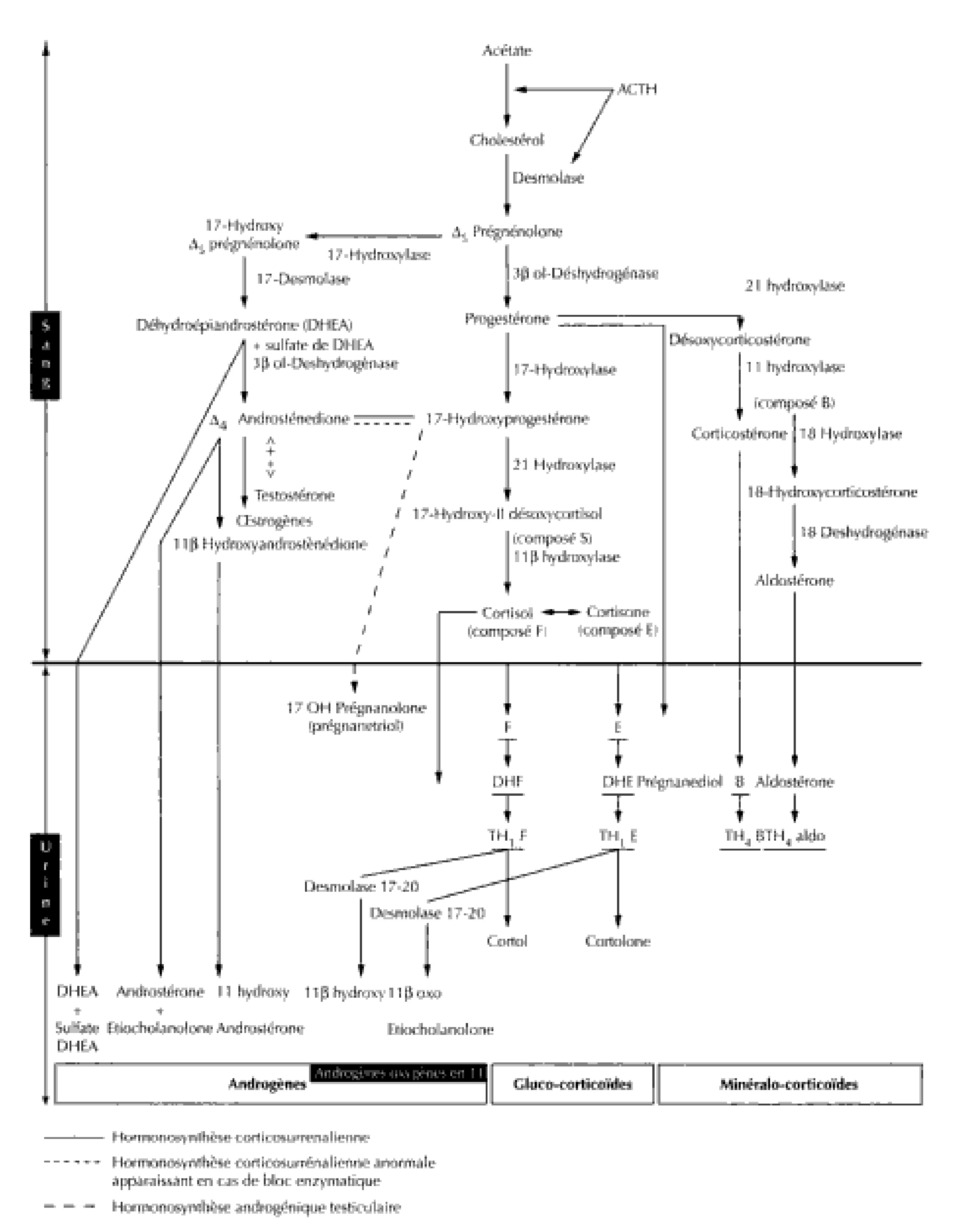



**Figure 1.** Hormonosynthèse corticosurrénalienne (EMC)

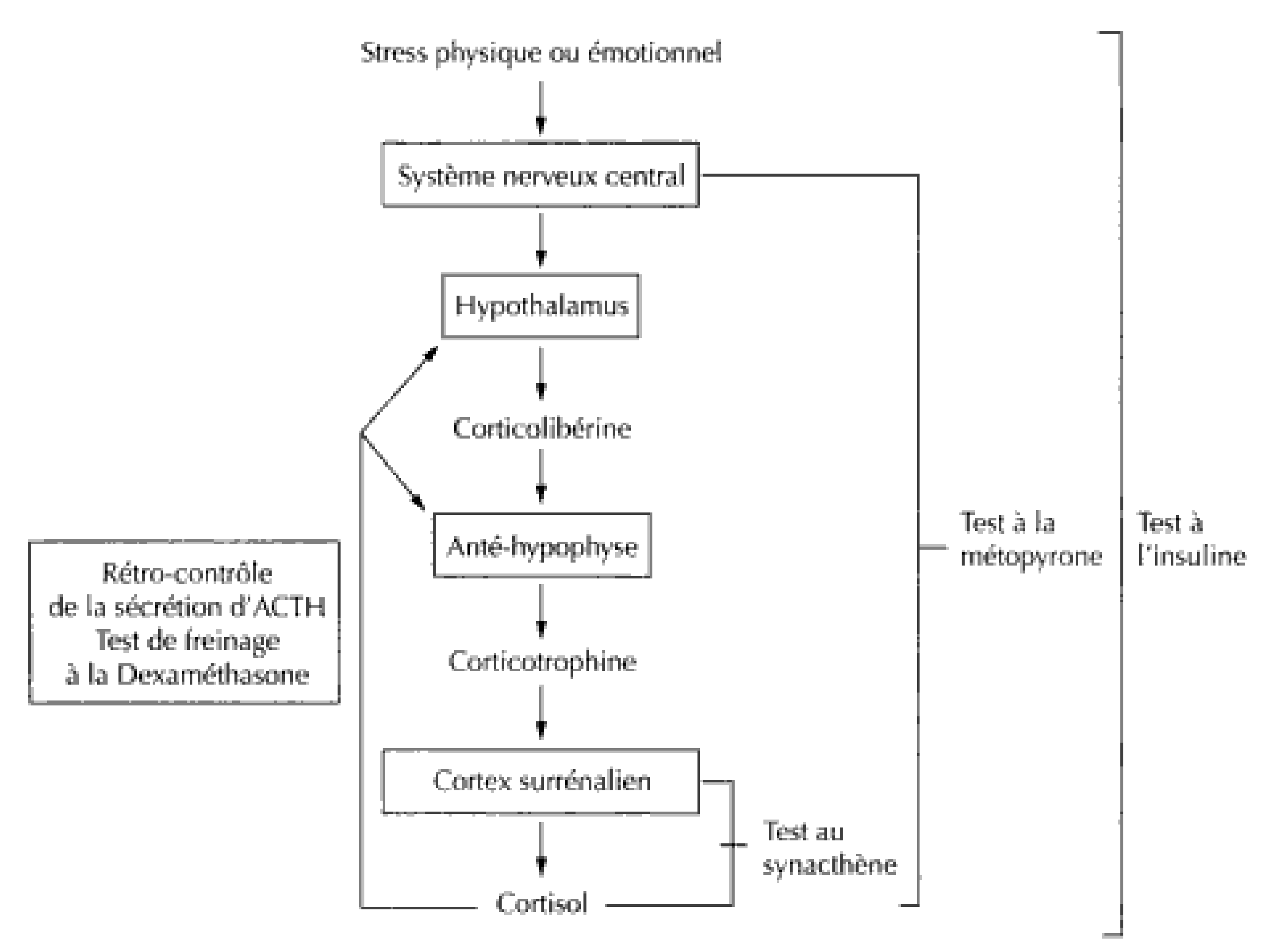



**Figure 2.** Mécanismes de régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. Examens permettant d'explorer l'intégrité de l'axe, et points d'impact de ces tests dans l'approche de la fonction corticotrope (d'après Briggs et Brotherton 1970b, *Corticosteroids, Hormones in Blood*, 3e ed., NY Academic Press)

# II. Hyperfonctionnements corticosurrénaliens

## A. Hypercorticismes métaboliques

### 1. Hypercorticismes purs : syndrome de Cushing

Le syndrome de Cushing définit l'ensemble des symptômes et signes cliniques qui surviennent à la suite d'une sécrétion chronique excessive des concentrations de cortisol circulant et de la perte de ses variations nycthémérales quelle qu'en soit l'étiologie. Les signes cliniques d'hypercortisolisme incluent : l'obésité tronculaire, le faciès lunaire, vergetures, ecchymoses, hypertension et intolérance au glucose. Il mérite attention car son évolution spontanée est grevée d'une mortalité et d'une morbilité considérables. Cela implique de poser un diagnostic précoce et d'établir avec précision son étiologie. De nombreux pièges font du diagnostic de syndrome de Cushing l'un des plus difficiles de l'endocrinologie.
L'enquête diagnostique va se dérouler en deux étapes successives : la première consiste à affirmer l'existence de l'hypercorticisme et la deuxième à établir son étiologie. Cette enquête peut s'avérer difficile ou délicate dans certaines situations

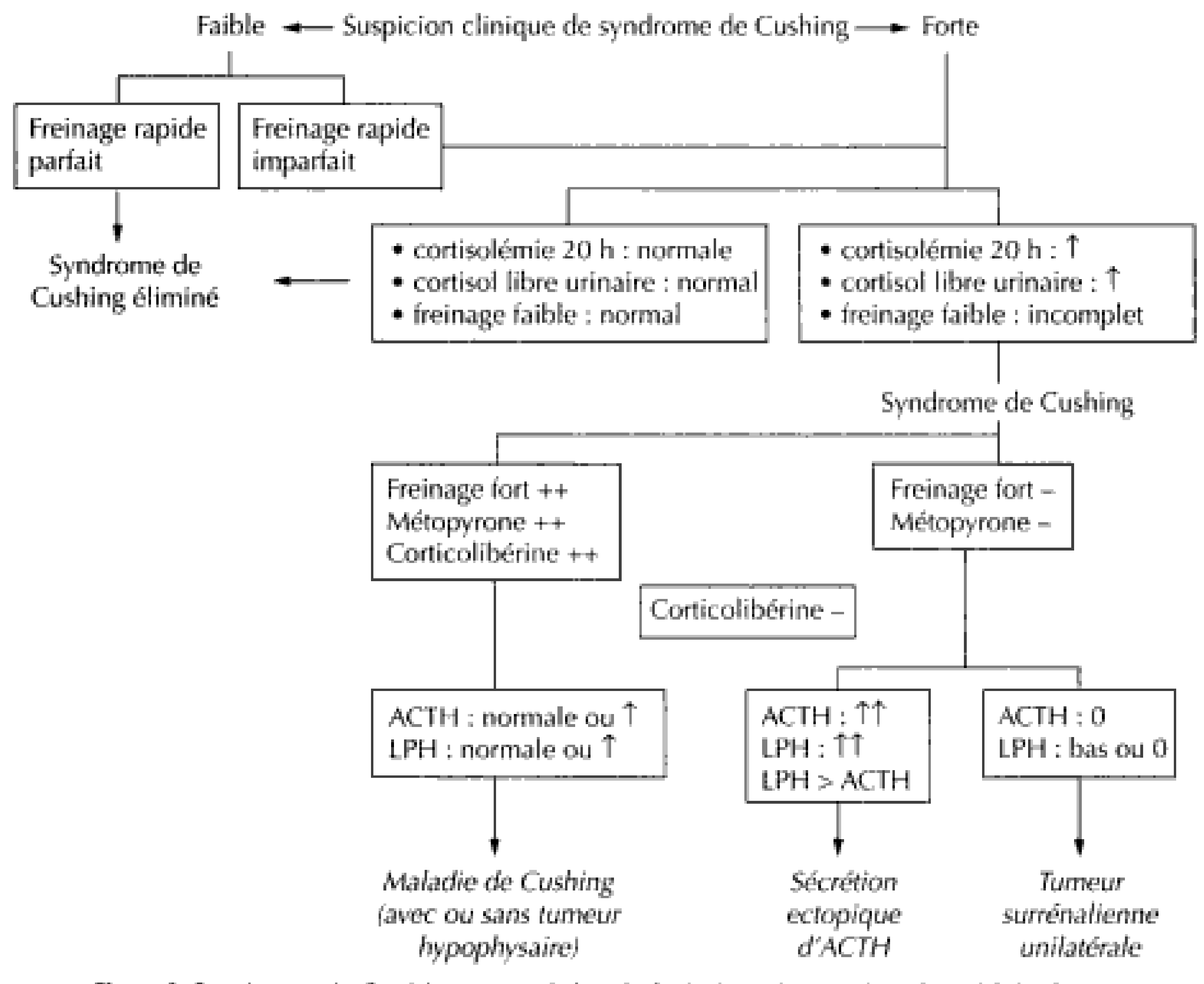



**Figure 3.** Syndrome de Cushing : stratégie générale lors des explorations biologiques (NB : tenir compte des remarques spécifiques formulées dans le texte)

pouvant reproduire les signes évocateurs d'un syndrome de Cushing. Chez la femme, ce syndrome peut entraîner des signes d'hirsutisme et une aménorrhée. Le principal signe chez l'enfant est l'arrêt de la courbe de croissance.

### a) Diagnostic positif du syndrome de Cushing

Ce diagnostic se fonde sur la mise en évidence d'une sécrétion excessive de cortisol, avec rupture du rythme circadien de la sécrétion, et dont l'intensité est peu modifiée par l'administration de corticoïdes.

#### ■ *Caractère excessif de la sécrétion de cortisol*

Les dosages plasmatiques sont peu intéressants dans cette indication. La cortisolémie matinale montre de larges chevauchements entre les valeurs normales et celles rencontrées dans le syndrome de Cushing. La cortisolémie vespérale est plus discriminative. La mesure de la cortisolémie à 0 heure, après pause préalable d'un cathéter veineux, est la plus fiable (normalement < 50 ng/ml).

Le dosage des 17 hydroxycorticostéroïdes urinaires doit être abandonné : c'est un dosage délicat et de nombreux chevauchements entre sujets hypercortisoliques et obèses sont retrouvés. Le dosage du cortisol urinaire des 24 heures reste l'exploration statique la plus performante pour le diagnostic de syndrome de Cushing (sensibilité et spécificité de l'ordre de 90 à 95 %). Le cortisol urinaire s'accroît de

ment des signes cliniques comme l'obésité (qui peut être majeure), l'hypertension artérielle, l'hirsutisme ou la dépression.
Dans l'éthylisme chronique en phase active on peut rencontrer un tableau clinique et biologique simulant le syndrome de Cushing.
L'insuffisance rénale, l'anorexie mentale et les situations de stress extrême peuvent s'accompagner de perturbations biologiques simulant un hypercorticisme, mais le tableau clinique ne prête généralement pas à confusion.
Stress chronique : observé de manière caricaturale au cours de certaines pathologies psychiatriques (phase dépressive des dépressions bipolaires). Cas de pseudo-syndrome de Cushing le plus délicat à résoudre. Il convient de garder à l'esprit que la dépression fait partie intégrante du syndrome de Cushing. La prévalence réelle du pseudo-syndrome de Cushing est de moins de 1 % à environ 10 % des patients adressés pour syndrome de Cushing.
Une activation fonctionnelle chronique de l'axe corticotrope. Un certain nombre d'arguments laissent supposer que cette activation fonctionnelle chronique de l'axe corticotrope est CRF (corticolibérine) dépendante et disparaît avec la guérison de l'affection causale ou l'amélioration de l'état psychiatrique.
Le tableau biologique associe de manière variable :

- une rupture du rythme circadien du cortisol peut être observée, mais le plus souvent celui-ci est conservé, en l'absence de stress majeur, à un niveau de cortisolémie supraphysiologique ;
- une élévation modérée du cortisol urinaire (en principe inférieure à quatre fois la limite supérieure de la normale du dosage). L'utilisation d'échantillons salivaires, aisément prélevables en ambulatoire est une alternative de choix dans ce contexte ;
- un freinage surrénalien « minute » voire « standard » négatif (ne concerne qu'environ 10 % des patients atteints de pseudo-syndrome de Cushing clinique). Dans ces cas difficiles, on réalise un test de freinage par dextrométhorphane (DXM) intraveineux. La cortisolémie le lendemain matin doit être < 25 ng/ml. Elle est supérieure à ce seuil dans tous les cas de syndrome de Cushing, témoignant d'un échappement précoce au freinage, caractéristique de ce syndrome ;
- l'ACTH plasmatique suit les mêmes fluctuations que celles du cortisol. Le tableau biologique est donc celui d'un hypercorticisme ACTH dépendant.

**Variabilité spontanée de la sécrétion de cortisol dans le syndrome de Cushing**
Si l'hypercorticisme du syndrome de Cushing est le plus souvent permanent, d'importantes fluctuations de son intensité ont également été décrites. Elles peuvent conduire à une interprétation erronée des tests dynamiques : freinage à la DXM apparemment « positif » en cas de syndrome de Cushing à l'inverse augmentation paradoxale de l'hypercorticisme après administration de DXM. Le syndrome de Cushing est intermittent, alternant des périodes d'hypercorticismes avec des périodes d'eucorticisme (syndrome de Cushing « cyclique »). L'apport du dosage du cortisol salivaire permet de mettre en évidence le caractère intermittent de l'hypercorticisme.

Les taux d'ACTH, classiquement très élevés (> 200 pg/ml dans 63 % des cas) dans les SCPN, sont en fait souvent du même ordre que ceux que l'on note dans la maladie de Cushing lorsque la tumeur ectopique est occulte.
La lipotrophine (LPH) est une molécule stable, sécrétée de façon équimolaire à l'ACTH. Le taux de LHP s'élève de manière disproportionnée par rapport à l'ACTH dans les SCPN. Ce rapport ACTH/LHP semble pouvoir être utilisé à titre diagnostique.
Toutefois, la maturation de la POMC varie d'une tumeur à l'autre, de sorte que ces marqueurs biologiques peuvent être pris en défaut.

### ■ *Exploration biologique dynamique*

#### Le test de freinage fort par la DXM

La procédure la plus anciennement décrite. Une diminution arbitraire d'au moins 50 % du cortisol urinaire le deuxième jour du test est classiquement en faveur d'une maladie de Cushing. Un freinage incomplet est observé dans 10 à 20 % des maladies de Cushing et un freinage positif dans environ 20 % des SCPN. La prévalence des faux positifs est particulièrement importante en cas de tumeur carcinoïde occulte puisqu'elle atteint 30 à 40 %. Cela peut être lié à la variabilité spontanée de l'hypercorticisme dans le temps. L'inconvénient du freinage fort classique est de nécessiter des recueils urinaires sur plusieurs jours, ce qui expose au risque de collection incomplète d'urines et à la survenue de fluctuations spontanées de l'hypercorticisme pouvant en imposer pour une réponse à l'administration de DXM. Un freinage fort d'une nuit : prise de 8 mg de DXM à 23 heures et dosage de la cortisolémie le lendemain à 8 heures a été proposé. Ce test aurait une meilleure sensibilité que le test fort classique.

#### Le test à la Métopirone®

Si cet examen permet d'observer, au niveau circulant, une forte réponse du composé S comparée aux sujets sains, s'expliquant par le maintien de la fonction corticotrope encore soumise à un certain degré de rétrocontrôle mais à un niveau anormalement élevé, il est peu informatif car dans de nombreux cas de SCPN la réponse est d'intensité identique à celle de la maladie de Cushing.

#### Test au CRF (*corticotropin releasing factor*)

Il permet de différencier la maladie de Cushing (qui répond) du SCPN (qui ne répond pas). Le critère de réponse le plus fiable est l'accroissement relatif de la concentration du cortisol qui doit dépasser 60 % dans la maladie de Cushing. Dans les SCPN, la réponse ne dépasse pas 28 % des valeurs de base. Des faux négatifs sont rencontrés dans environ 10 % des cas de maladie de Cushing. Sensibilité équivalente à celle du freinage fort à la DXM, spécificité légèrement supérieure. Les cas de tumeurs ectopiques répondant à la CRF sont très rares. Si une réponse négative à la CRF ne permet pas d'éliminer la maladie de Cushing, une réponse franche permet d'exclure un SCPN avec une forte probabilité. Le test a donc une assez bonne valeur prédictive qui semble augmenter s'il est couplé au freinage fort à la DXM. La réalisation du test en phase d'hypercortisolisme est une précaution indispensable, des réponses aberrantes pouvant être obtenues après traitement par les anticortisoliques ou lors d'une phase de rémission des SCPN intermittents.

### 2. Hyperandrogénies mixtes

Dans certains cas, l'hyperandrogénie peut être associée à une production accrue de gluco- et minéralocorticoïdes. Dans ce contexte, il faudra toujours craindre une origine tumorale maligne. Une association à une hyperœstrogénie qui se traduit purement sur le plan biologique doit suffire à éveiller les soupçons. L'association à un syndrome d'hypersécrétion minéralocorticoïde révélé sur le plan clinique et biologique témoigne de la libération de métabolites anormaux – ou précurseurs de l'aldostérone – secondaire à un trouble enzymatique.
Le dernier cas, le plus fréquent, définit l'association à une production accrue de glucocorticoïdes pouvant reproduire un véritable syndrome de Cushing qui coexiste avec un tableau clinique de virilisation.
Ces formes mixtes sont moins rares chez l'enfant. Ces perturbations métaboliques surajoutées viennent extérioriser la poussée néoplasique.

## C. Hyperminéralocorticismes

Tout excès de minéralocorticoïdes entraîne, par stimulation des récepteurs minéralocorticoïdes de type I, notamment au niveau des tubules rénaux distaux, deux conséquences sur le métabolisme ionique. D'une part, une rétention de chlorure de sodium (NaCl) avec de l'eau, ayant pour conséquences hypervolémie et hypertension artérielle. D'autre part, une perte urinaire de chlorure de potassium (KCl) entraînant une hypokaliémie, souvent aggravée et révélée par l'administration d'un agent diurétique. L'hypokaliémie chronique engendre à son tour une fuite d'ions hydrogène et, par conséquent, une alcalose métabolique.
L'origine des hyperminéralocorticismes peut être l'aldostérone, un autre minéralocorticoïde ou être consécutif à la prise de certaines substances (réglisse, 9α-fludrocortisone). Les hyperminéralocorticismes purs se confondent en pratique avec les hyperaldostéronismes : les uns, primaires, appartiennent seuls à l'endocrinologie, les autres, secondaires, s'observent au cours d'affections très diverses où l'aldostérone n'intervient qu'à titre de relais.

### 1. Hyperaldostéronismes primaires : syndrome de Conn

C'est la forme classique de l'hyperaldostéronisme primaire. Sa fréquence n'est pas négligeable, avec une prédilection toute particulière chez la femme entre 20 et 50 ans. L'hypertension en est l'élément majeur. Elle est, en règle générale, modérée, stable et assez peu évolutive. Les signes cliniques associés sont fortement évocateurs mais relativement inconstants : accès paroxystiques de faiblesse musculaire, syndrome polyurodypsique modéré. L'absence d'œdème est remarquable et est à noter. En réalité, les formes atypiques sont très fréquentes. Ce syndrome est associé à une production excessive d'aldostérone par la zone glomérulée de la corticosurrénale, une hypokaliémie, des taux de rénine abaissés ou une activité rénine basse. Il est clair que la sécrétion d'aldostérone dans ce syndrome n'est pas autonome, à l'exception peut-être des patients chez lesquels un carcinome surrénalien a été décelé.
La plupart du temps, au cours de ce syndrome, l'aldostérone plasmatique a conservé son rythme circadien parallèle à celui du cortisol dont les concentrations

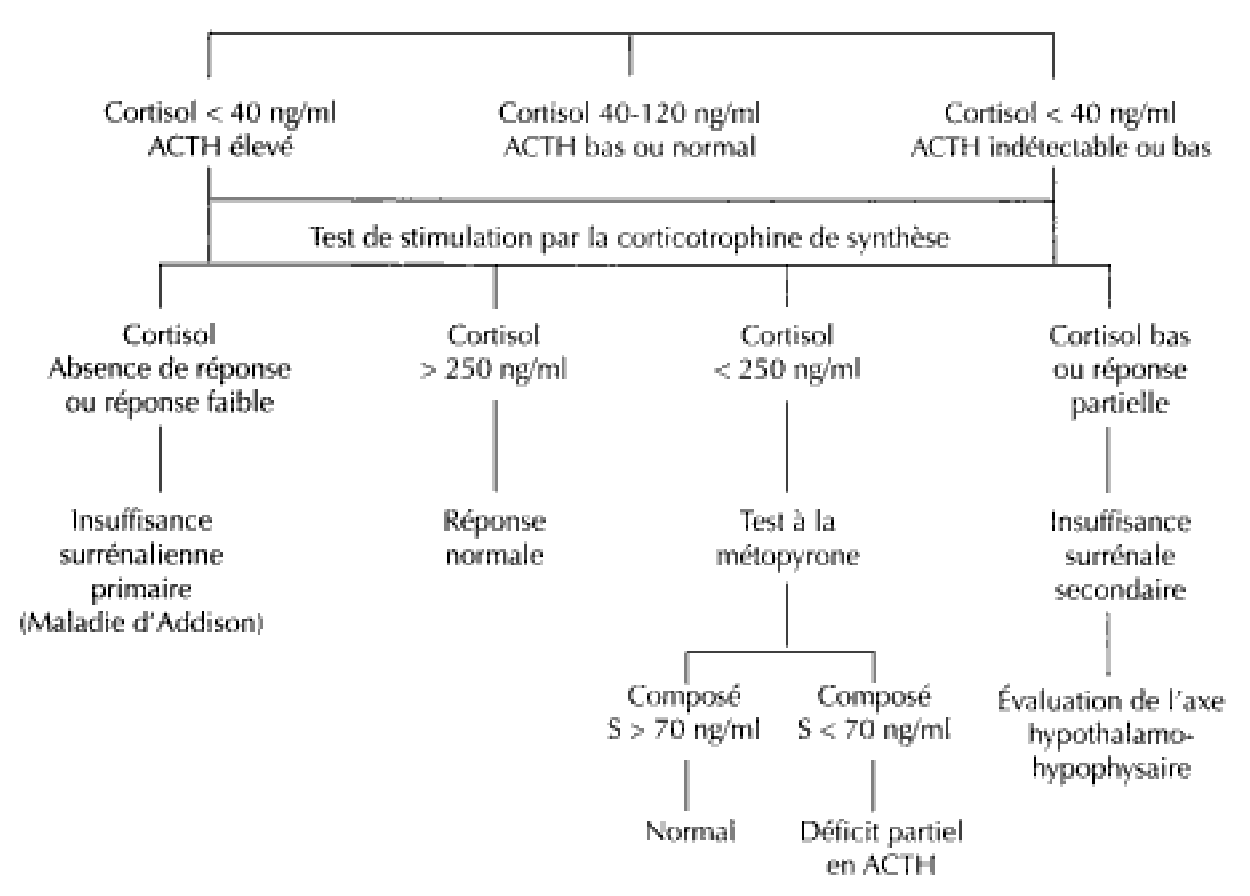



**Figure 5.** Intérêt diagnostic des dosages plasmatiques du cortisol et de l'ACTH dans l'exploration d'une insuffisance surrénalienne.
Concentrations plasmatiques de cortisol et ACTH à l'état basal le matin à 8 heures

Dans ce contexte, il existe une insuffisance surrénalienne caractéristique et généralisée qui est bien révélée par des taux bas de cortisol plasmatique à l'état basal et par une absence de réponse significative des stéroïdes à l'administration d'ACTH. Les concentrations plasmatiques d'ACTH et de rénine sont nettement augmentées, ce qui est en accord avec le rétrocontrôle de la régulation des gluco- et minéralo-corticoïdes. Les taux de sécrétion et d'excrétion d'aldostérone sont nuls alors que l'excrétion rénale sodée met en évidence une incapacité à retenir le sodium.

### b) Formes dissociées

Elles apparaissent plus rares. On y retrouve :

- l'hyperplasie congénitale des surrénales, qui traduit un trouble fonctionnel dont l'expression clinique majeure est l'hyperandrogénie. Cette maladie entre dans le cadre des insuffisances surrénales lorsque le déficit en glucocorticoïdes, provoqué par l'interruption de la chaîne d'hormonosynthèse, s'exprime nettement. Cette situation se retrouve environ chez un tiers des patients atteints d'un déficit en 21-hydroxylase affectant la voie de biosynthèse du cortisol ;
- l'hypoaldostéronisme primaire isolé : rare, il atteint surtout le jeune enfant où il est congénital et responsable de graves accidents de déshydratation aiguë. Il s'agit d'un syndrome biologique de perte de sel lié à un déficit enzymatique en 18-hydroxylase impliquée dans la transformation de corticostérone en aldostérone. Ulick décrit les deux erreurs retrouvées à la naissance qui peuvent affecter les étapes finales de la biosynthèse d'aldostérone :

## Conclusion

La conduite à tenir devant toute altération de la sécrétion corticosurrénalienne sera :

- établir le diagnostic positif ;
- apprécier la sévérité de l'atteinte ;
- rechercher l'étiologie ;
- adapter l'intervention (thérapeutique et/ou chirurgicale) et surveiller la réponse au traitement.

## L'essentiel de la question

L'ensemble des mécanismes de régulation et de production impliqués dans le bon fonctionnement de la corticosurrénale peut être mis en défaut. Il s'ensuit une dérégulation qui peut se traduire soit par un hyperfonctionnement, soit par un hypofonctionnement corticosurrénalien d'importance variable. Au sein des hyperfonctionnements, nous retiendrons :

- les hypercorticismes métaboliques :
  - les « purs » auxquels appartient le syndrome de Cushing. La première étape consiste à en poser le diagnostic positif (mise en évidence d'une sécrétion excessive de cortisol, rupture du rythme circadien de la sécrétion, l'intensité peu modifiée par l'administration de corticoïdes) en tenant compte des différents écueils qui peuvent se présenter (interactions médicamenteuses, situations pathologiques simulant biologiquement un syndrome de Cushing, variabilité spontanée de la sécrétion de cortisol dans le syndrome de Cushing). La seconde étape consiste à établir la classification physiopathologique de l'étiologie fondée sur l'ACTH indépendance ou dépendance de l'hypercorticisme, et donc l'origine « primitivement » surrénalienne (tumeur du cortex : adénome, carcinome ; cas des incidentalomes) ou non de celui-ci (maladie de Cushing, syndrome de Cushing paranéoplasique, cas du syndrome de résistance aux glucocorticoïdes),
  - les mixtes, associés à un hyperminéralocorticisme ou à une hyperandrogénie ;
- les hypercorticismes androgéniques : l'hypersécrétion d'androgènes par le cortex surrénalien peut créer un syndrome de virilisation qui n'a d'expression clinique que chez la femme ou chez l'enfant des deux sexes. Elle peut être isolée [hyperandrogénie pure (dont les principales causes sont l'hyperplasie congénitale des surrénales due à un déficit enzymatique : 21-hydroxylase (le plus fréquent), 11β-hydroxylase, 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase) et les tumeurs virilisantes (adénome, carcinome)] ou accompagnée d'hypersécrétion d'autres stéroïdes corticaux (hyperandrogénies mixtes) ;
- les hyperminéralocorticismes : ils se confondent en pratique lorsqu'ils sont « purs » avec les hyperaldostéronismes. Les uns sont primaires (syndrome de Conn : le plus souvent, il s'agit d'adénome, fréquemment d'hyperplasies bilatérales des surrénales, plus rarement de carcinome) et appartiennent seuls à l'endocrinologie. Les autres sont secondaires et s'observent au cours d'affections très diverses (maladies auto-immunes, tuberculose, etc.) où l'aldostérone n'intervient

qu'à titre de relais. Au sein des hypofonctionnements, nous retiendrons les insuffisances surrénales lentes comprenant les insuffisances surrénales primitives (maladie d'Addison quelque en soit la cause) et les formes dissociées plus rares (hyperplasie congénitale des surrénales, hypoaldostéronisme primaire isolé, insuffisances surrénales primaires avec respect de la fonction corticoïde), et les insuffisances surrénales secondaires à un hypopituitarisme ou à une thérapie au long avec des glucocorticoïdes.

En conclusion, la conduite à tenir devant toute altération de la sécrétion corticosurrénalienne sera : établir le diagnostic positif, apprécier la sévérité de l'atteinte, rechercher l'étiologie, adapter l'intervention (thérapeutique et/ou chirurgicale) et surveiller la réponse au traitement.

***Pour en savoir plus***


- Bricaire H., Leprat J. Corticosurrénales. *La Pathologie médicale : Glandes endocrines*, Vallery-Radot P., Hamburger J., Lhermitte F. Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 1976 ; 10 : 255-82.
- Schlienger J.-L., André G., Chabrier G. *et al.* « Les surrénales » in *Explorations fonctionnelles en endocrinologie et métabolisme*, Paris, Expansion scientifique française, 1986 ; 23-54.
- Kuttenn F., Bricaire C. « Hirsutisme d'origine surrénalienne » in Mauvais-Jarvis P. *Médecine de la reproduction*. L'Hirsutisme. Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 1988 ; 83-141.
- Luton J.-P., Thomopoulos P., Basdevant A. *Endocrinologie, nutrition et maladies métaboliques*. « Traité de médecine », Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 1999 ; 49-61.
- Tabarin A. *La maladie de Cushing*. « Endocrinologie et Métabolisme », Montrouge, John Libbey Eurotext, 2000.

# Pathologie thyroïdienne

F. DURON, Service d'endocrinologie, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris.
J. GUECHOT, Laboratoire d'hormonologie, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris.

## V. Anomalies morphologiques de la thyroïde : les goitres

**A.** Définitions
**B.** Épidémiologie
**C.** Classification
**D.** Étiologie, physiopathologie
**E.** Exploration d'un goitre
**F.** Complications
**G.** Traitement

## VI. Anomalies morphologiques de la thyroïde : les cancers thyroïdiens

**A.** Variétés histologiques des cancers thyroïdiens et physiopathologie
**B.** Diagnostic et principes du traitement
**C.** Conduite à tenir devant un nodule thyroïdien

Ces rapports expliquent les possibilités de lésion (glandes parathyroïdes et nerfs récurrents) lors d'une intervention chirurgicale, ou de compression (nerfs récurrents, trachée, œsophage) lorsqu'il existe un goitre volumineux.
Le poids habituel de la thyroïde est d'environ 20 g. Il est plus élevé dans les pays de carence iodée, plus faible dans les régions bénéficiant d'un fort apport en iode.

### 3. Histologie

Les cellules thyroïdiennes vésiculaires (ou folliculaires, ou thyréocytes) sont des cellules polarisées comportant un pôle apical hérissé de microvillosités, en contact avec le colloïde, et un pôle basal en contact avec la circulation sanguine. Ces cellules reliées entre elles par leur paroi latérale et forment une couronne dont la lumière, au pôle apical, contient une substance amorphe appelée « colloïde ». L'ensemble est appelé « follicule (ou vésicule) thyroïdien ».
Les cellules C (ou parafolliculaires), en nombre très faible et plus volumineuses, sont situées à côté des cellules folliculaires. La distribution préférentielle de ces cellules se situe à l'union tiers moyen-tiers supérieur de chaque lobe : c'est la zone de localisation des cancers dérivés de ces cellules (*voir « Cancers médullaires de la thyroïde »*).
L'ensemble est soutenu par des cloisons fibreuses formées de fibroblastes qui constituent environ 30 % du poids de la glande.

## B. Physiologie hormonale

### 1. Synthèse des hormones thyroïdiennes

La synthèse des HT s'effectue :
- dans une grosse protéine, la *thyroglobuline* (TG), synthétisée par la cellule thyroïdienne et composant essentiel du colloïde folliculaire situé dans les vésicules thyroïdiennes ;
- à partir des résidus tyrosine de la thyroglobuline ;
- et à partir de l'*iodure* apporté par l'alimentation, capté par la thyroïde de manière active par un *symporteur Na-I* (NIS) situé au pôle latéro-basal de la cellule vésiculaire ;
- la *thyroperoxydase* (TPO), localisée au pôle apical des cellules, est une enzyme spécifique de la thyroïde, couplée à un système générateur d'$H_2O_2$. Elle permet l'oxydation (organification) de l'iodure et son incorporation dans la thyroglobuline par couplage avec les résidus tyrosine, avec formation de mono-iodotyrosine (MIT) et di-iodotyrosine (DIT), puis de tri-iodothyronine (MIT + DIT) et de tétra-iodothyronine ou thyroxine (DIT + DIT).

L'expression des gènes de la TG, du NIS et de la TPO est sous la dépendance de la thyréostimuline hypophysaire (TSH).

### 2. Stockage

L'iodation de la thyroglobuline s'effectue au pôle apical de la cellule vésiculaire, puis la protéine iodée est excrétée dans la lumière du follicule sous forme d'une solution colloïdale, le *colloïde*. La quantité de colloïde stockée dépend de l'activité

de la thyroïde. Cette accumulation explique le long délai d'action des médicaments antithyroïdiens qui inhibent la peroxydase mais ne peuvent réduire le stock d'hormones déjà préformées.

## 3. Sécrétion

Pour que la sécrétion hormonale puisse survenir, il faut que la thyroglobuline contenue dans le colloïde soit réabsorbée par la cellule puis dégradée. La réabsorption des gouttelettes de colloïde se fait par endocytose, puis des protéases lysosomiales scindent les hormones thyroïdiennes T4 et T3 de la TG. Quant aux MIT et DIT, ils sont déiodés (déiodase de type I) et l'iode est recyclé. La déiodase permet également la transformation intrathyroïdienne de T4 en T3.

La principale hormone sécrétée par les cellules vésiculaires est la tétra-iodothyronine ou *thyroxine* (T4). La 3,5',3'-tri-iodothyronine (T3) est sécrétée en plus faible quantité (dix fois moins) ainsi que son isomère inactif, la reverse T3 (rT3) (3,3',5'-tri-iodothyronine).

Les cellules parafolliculaires de la thyroïde, ou *cellules C*, sécrètent une autre hormone, la *calcitonine*, impliquée dans le métabolisme osseux chez le fœtus. Son rôle physiologique est moins évident après la naissance.

Quant à la thyroglobuline, elle n'est pas confinée au colloïde. Elle est également sécrétée en petite quantité dans le sang. Nous verrons plus loin l'intérêt de son dosage.

## 4. Circulation

La plus grande partie de la T3 circulante provient de la *monodéiodation* de la T4 dans les tissus, surtout le foie et le rein, mais aussi la thyroïde, sous l'action de la *monodéiodase de type I*.

L'hypophyse possède une *monodéiodase de type II*, capable de transformer localement la T4 en T3.

Les hormones thyroïdiennes circulent, pour une faible part, sous forme libre et, pour leur plus grande part, sous forme liée à une protéine porteuse, la *TBG* (*thyroid-binding globulin*), plus accessoirement à la préalbumine (ou transthyrétine) et à l'albumine.

## 5. Action sur les tissus cibles

Les hormones thyroïdiennes ont une action sur la thermogenèse et les métabolismes intermédiaires de pratiquement tous les tissus de l'organisme, notamment le cœur, le foie, le muscle, l'os, le tissu adipeux, le système nerveux. Cette action se fait essentiellement par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires qui sont des hétérodimères formés par le couplage du récepteur aux HT (dont il existe quatre isoformes) et du récepteur de l'acide rétinoïque (action dite « génomique » des HT). Il existe également une action dite « non génomique », non médiée par un récepteur et très rapide, intervenant sur de multiples voies de transduction de signal intracellulaire.

Les hormones actives sont les *hormones libres*, essentiellement la T3 libre (T3L) : le récepteur nucléaire a une affinité dix fois plus grande pour la T3 que pour la T4.

**Tableau 1.** Prescription des dosages hormonaux thyroïdiens : références médicales opposables (RMO) 1998

| Références médicales opposables (1998) |
| --- |
| *Prescription du dosage des hormones thyroïdiennes chez l'adulte :*<br>– Il n'y a pas lieu de prescrire un dosage des hormones thyroïdiennes dans le cadre des bilans biologiques effectués chez des patients asymptomatiques.<br>– Il n'y a pas lieu, devant un patient pour lequel on recherche une hypothyroïdie suspectée cliniquement, de doser la T3L.<br>– Il n'y a pas lieu, chez un patient qui reçoit un traitement hormonal substitutif pour une hypothyroïdie, de doser, parmi les examens de surveillance, la T3L s'il est traité par L-thyroxine, ou la T4L s'il est traité par tri-iodothyronine.<br>– Il n'y a pas lieu, au cours de la surveillance d'un patient atteint d'une hypothyroïdie recevant un traitement substitutif, une fois l'équilibre du traitement atteint et en l'absence de pathologie cardiovasculaire, de répéter les dosages hormonaux plus de deux fois par an. |
| *Bilans biologiques systématiques :*<br>Chez un patient asymptomatique, sans antécédents pathologiques ou facteurs de risque particuliers, sans signes d'appel évocateurs et dont l'examen clinique est normal, il n'y a pas lieu, notamment en première intention, de prescrire un dosage de TSH et/ou d'hormones thyroïdiennes. |

## 3. La TSH (*tab. 1*)

Le dosage de la TSH est le meilleur moyen d'apprécier la concentration intrahypophysaire de T3, reflet de l'hormonémie tissulaire. Il peut donc permettre de dépister une dysthyroïdie alors même que l'hormonémie périphérique est normale. *C'est le premier examen à demander lorsqu'une dysthyroïdie est suspectée* :

- Si la TSH est normale, il n'y a pas de dysthyroïdie.
- Si la TSH est élevée, il y a une hypothyroïdie.
- Si la TSH est basse, il y a vraisemblablement une hyperthyroïdie. (Il existe d'autres causes de diminution de la TSH.)

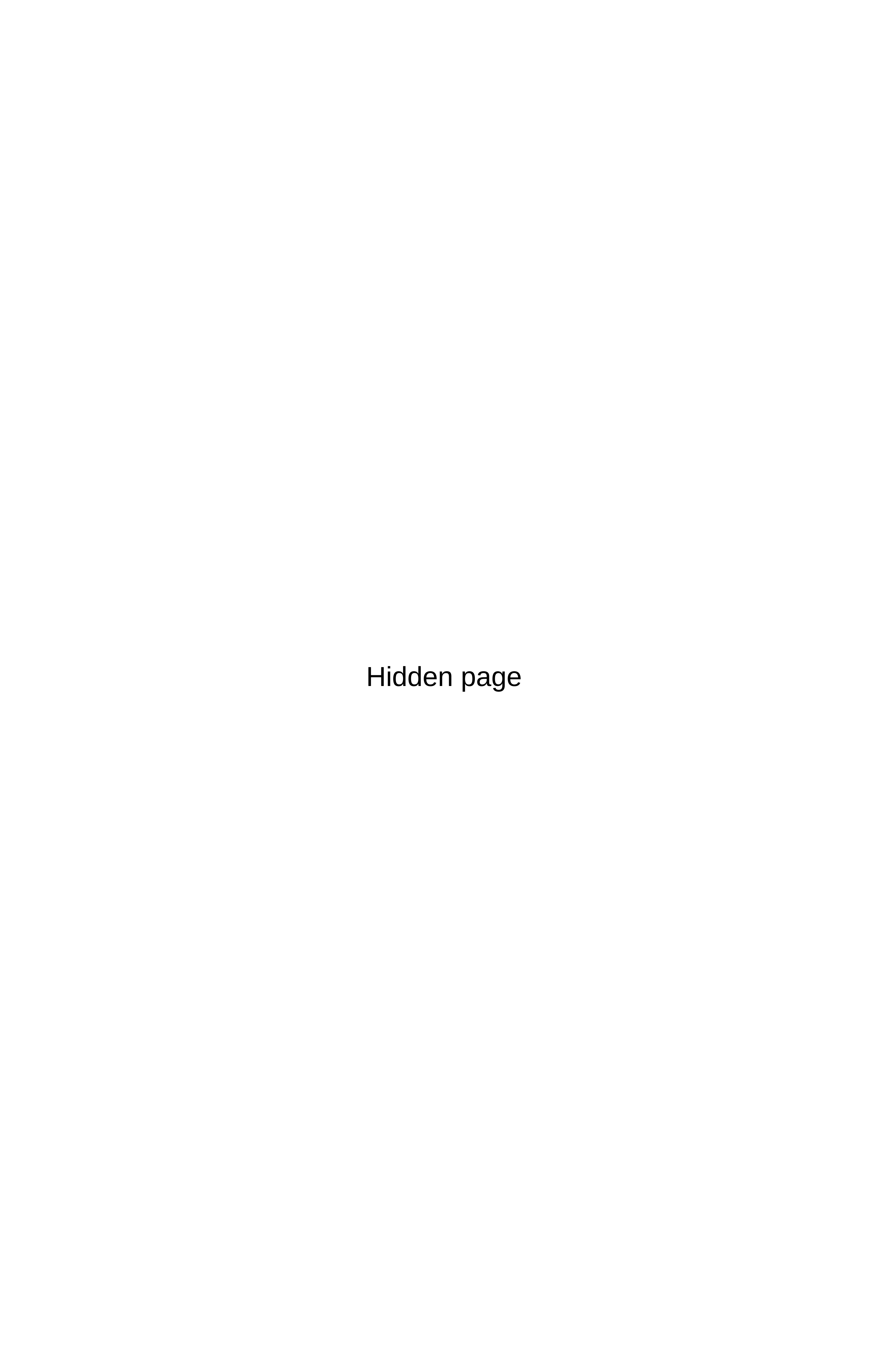
Ce schéma n'est pas valable lorsqu'il s'agit de pathologie hypophysaire.

Lorsque la TSH est anormale, le dosage de T4L permettra de savoir le degré de la dysfonction thyroïdienne.

L'interprétation du résultat du dosage de la TSH (réalisé par immunoenzymologie ou, mieux, par immunoradiométrie [IRMA] ou immunoluminométrie) est soumise aux mêmes règles de prudence que celles qui sont adoptées pour une hormonémie périphérique. Pour la plupart des laboratoires, le taux normal se situe entre 0,3 et 5 mU/L.

## 4. Thyroglobuline

La thyroglobuline est élevée dans la plupart des maladies thyroïdiennes et présente peu d'intérêt diagnostique, sauf après une thyroïdectomie totale pour cancer : lorsque toute la thyroïde a été enlevée, son taux doit être nul. Un taux détectable de thyroglobuline après thyroïdectomie totale signifie qu'il reste des résidus thyroïdiens ou des métastases. Ce dosage est perturbé par la présence d'anticorps antithyroglobuline, qu'il est nécessaire de détecter par une interprétation correcte des résultats.



- Elle révèle la nature solide, liquide ou mixte des nodules et les mesure.
- Elle révèle des anomalies de la glande échappant à la palpation.
- Elle permet de détecter des adénopathies.
- Elle permet d'étudier la vascularisation de la glande (échographie, doppler).
- Elle sert d'examen de référence et permet de suivre l'évolution de la thyroïde.

### 4. Exploration cytologique

La ponction à l'aiguille fine (ou cytoponction) des nodules thyroïdiens est un geste simple très peu traumatique. Elle est réalisée à l'aveugle ou sous contrôle échographique et permet :
- d'évacuer un kyste et d'analyser le liquide de ponction ;
- de faire une analyse cytologique des cellules recueillies après ponction d'un nodule tissulaire. On peut ainsi recueillir collecter des arguments en faveur de la bénignité ou de la malignité d'un nodule. Néanmoins, cet examen demande des mains entraînées (pratiquant plus de dix ponctions par semaine) et la lecture des lames est difficile : la fiabilité diagnostique est bonne mais n'est pas totale. Les résultats de la cytoponction sont classés en :
  - ininterprétables (pas assez de cellules) : 5-20 % : à refaire ;
  - bénins : 65-75 % : nodules colloïdes, adénomes macrovésiculaires, thyroïdites ;
  - douteux : 10-30 % : nodules microvésiculaires, lésions oncocytaires (ou oxyphiles) ;
  - malins : 5-10 % : cancers papillaires, anaplasiques et médullaires. Le diagnostic cytologique des cancers vésiculaires est pratiquement impossible.

# III. Dysthyroïdies : hyperthyroïdies

## A. Définition

Hypersécrétion non freinable d'hormones thyroïdiennes par le corps thyroïde : le rétrocontrôle est inefficace.

## B. Étiologies, physiopathologie

### 1. Maladie de Basedow (ou maladie de Basedow-Graves ou Graves' disease)

- Il s'agit de la cause la plus fréquente des hyperthyroïdies.
- Prévalence : 1 à 2 % de la population générale. *Sex ratio* F/H = 10. Elle se rencontre surtout chez la femme jeune.
- Maladie *auto-immune*, parfois associée à d'autres maladies auto-immunes : orbitopathie surtout, mais aussi maladie de Biermer, diabète insulinodépendant, vitiligo, syndrome de Gougerot-Sjögren, etc.

- Elle survient sur un terrain génétiquement prédisposé : elle est parfois associée (mais pas, constamment) aux groupes HLA-B8 et DR3.
- Elle est due à un défaut de surveillance des lymphocytes T suppresseurs conduisant à la production par les lymphocytes B d'immunoglobulines stimulant la thyroïde (TSI : *thyroid-stimulating immunoglobulins*). Ces anticorps se fixent sur le récepteur de la TSH et miment l'action de la TSH.
- Rôle déclenchant possible du stress (peut-être par diminution de la fonction des lymphocytes T suppresseurs).
- Évolution spontanément cyclique, par poussées et rémissions.

## 2. Nodules hypersécrétants

- Unique (adénome toxique, AT) ou multiples (goitres multinodulaires toxiques, GMNT).
- Adénomes vésiculaires sécrétant une quantité excessive d'hormones thyroïdiennes : ils freinent la TSH et l'activité du parenchyme sain.
- Des mutations somatiques (au niveau du nodule) du récepteur de la TSH ou de la protéine $G_s\alpha$ couplée au récepteur, entraînant son activation constitutive (récepteur activé sans l'intervention de la TSH) ont été récemment mises en évidence dans des adénomes toxiques et seraient dans la plupart des cas la cause de cette affection.
- Les GMNT pourraient être dus à la réplication préférentielle de cellules thyroïdiennes plus actives que les autres et, de fait, l'évolution naturelle des goitres nodulaires se fait souvent vers la thyrotoxicose. Cette dernière peut aussi être déclenchée par un apport massif d'iode, surtout dans les régions de carence iodée. Des mutation somatiques ont été également décrites au niveau des nodules actifs.
- Les adénomes toxiques et les goitres multinodulaires toxiques surviennent surtout chez la femme, mais à un âge plus avancé que celui de la maladie de Basedow.

## 3. Hyperthyroïdies iatrogènes

### a) Induites par l'iode

L'amiodarone (Cordarone®) est le plus souvent en cause. D'autres médicaments iodés, ou produits de contraste, peuvent être à l'origine d'une hyperthyroïdie. Souvent, ces produits ne font que révéler une thyropathie sous-jacente, l'apport important d'iode entraînant la toxification d'un ou plusieurs nodules. La Cordarone peut également, sur thyroïde saine, jouer un rôle toxique et entraîner des lésions semblables à celles des thyroïdites subaiguës.

### b) Toxicoses « factices »

Elles sont dues à la prise, souvent cachée, d'hormones thyroïdiennes pour maigrir.

## 4. Thyroïdites subaiguës

La lyse des cellules thyroïdiennes peut entraîner, au début de la maladie, une thyrotoxicose transitoire, habituellement suivie d'une phase d'hypothyroïdie avant la récupération qui se fait en environ trois mois.

– d'origine auto-immune, due à l'infiltration des muscles et de la graisse ou IRM orbitaire par des complexes immuns ;
– sans rapport avec le degré de thyrotoxicose ni avec son traitement, elle évolue pour son propre compte. Elle se manifeste, dans sa forme non compliquée, par :
  - *une exophtalmie* : protrusion bilatérale, plus ou moins symétrique du globe oculaire, axile, indolore, réductible, avec photophobie, larmoiement, hyperhémie conjonctivale, pigmentation de la paupière supérieure. Elle peut être mesurée cliniquement à l'aide de l'ophtalmomètre de Hertel afin de suivre l'évolution,
  - *une rétraction palpébrale*, due à l'infiltration du releveur de la paupière supérieure. Elle s'accompagne d'une asynergie palpébrale (*signe de De Graefe*) : lors du regard vers le bas, la paupière ne suit qu'avec retard le mouvement du globe oculaire et l'iris se trouve entièrement découvert,
  - *un œdème des paupières* dont l'importance peut masquer celle de l'exophtalmie.

• La dermopathie (ou myxœdème prétibial) :
  – très rare en France ;
  – dûe à l'infiltration du tissu sous-cutané par des complexes immuns et spécifiques de la maladie de Basedow ;
  – placard rouge, infiltré, surélevé, sensible, de la face antérieure de la jambe.

#### b) Nodules hypersécrétants

• Syndrome de thyrotoxicose pur, *jamais d'ophtalmopathie* (pour certains, possibilité de rétraction palpébrale dite « adrénergique »).
• Palpation d'un ou plusieurs nodules thyroïdiens.

#### c) Hyperthyroïdies iatrogènes

• Notion de prise de produit iodés ou d'hormones thyroïdiennes.
• Pas de goitre en cas de toxicose factice. Dans les hyperthyroïdies induites par l'iode, la présence d'un goitre doit faire rechercher une thyropathie sous-jacente.

#### d) Thyroïdites subaiguës

• Contexte inflammatoire et fébrile.
• Thyroïde augmentée de volume, souvent très douloureuse.

## D. Examens complémentaires

### 1. Communs à toutes les étiologies

#### a) Retentissement de l'hyperthyroïdie

• Diminution du cholestérol (en tenant compte des chiffres antérieurs).
• Leuconeutropénie.
• Hypercalcémie.
• Élévation des enzymes hépatiques.
• Tendance à l'hyperglycémie.

### 3. La crise aiguë thyrotoxique

Devenue rare, elle se rencontrait surtout en postopératoire, chez des basedowiens insuffisamment préparés à l'intervention. Il s'agit d'une urgence et le tableau est dramatique, associant :

- des *signes majeurs d'hypermétabolisme* : amaigrissement très rapide, fièvre, sueurs profuses, déshydratation, diarrhée sévère, quadriparésie ;
- des *troubles cardiovasculaires* : troubles du rythme, insuffisance cardiaque ;
- des *troubles neuropsychiques* : délire, agitation extrême, voire coma.

En l'absence de traitement urgent, et parfois malgré celui-ci, l'évolution peut être mortelle.

## F. Formes cliniques

### 1. Chez l'homme

L'hyperthyroïdie est plus rare chez l'homme que chez la femme. Elle est classiquement plus grave, peut-être en raison d'un diagnostic plus tardif. À noter l'existence, fréquente, d'une *gynécomastie*. (l'augmentation de la SBP entraîne une diminution de la fraction libre de la testostérone).

### 2. Chez le sujet âgé

L'hyperthyroïdie est souvent peu bruyante, se traduisant surtout par une *altération de l'état général* avec fonte musculaire et amaigrissement massif. Elle se révèle souvent par des *troubles cardiaques* devant lesquels il faut savoir évoquer une thyrotoxicose. Elle est due surtout à un adénome toxique ou à un goitre multinodulaire toxique.

### 3. Chez la femme enceinte

L'hyperthyroïdie est possible puisqu'elle n'est pas cause d'infertilité, surtout lorsqu'elle est traitée. Le diagnostic peut être difficile car les symptômes de thyrotoxicose ressemblent aux signes sympathiques de grossesse, d'autant plus qu'un petit goitre est fréquent au cours de la gestation. Le passage transplacentaire d'anticorps est possible avec risque de thyrotoxicose basedowienne fœtale ou néonatale transitoire, mais les difficultés viennent aussi du traitement de l'hyperthyroïdie maternelle : les antithyroïdiens de synthèse passent la barrière placentaire et pourraient occasionner un goitre et/ou une hypothyroïdie chez le fœtus (voir « *Traitement* »).

## G. Traitement

### 1. Maladie de Basedow

#### a) Moyens

■ *Médicaments*

Antithyroïdiens de synthèse (ATS).

**Dérivés des thionamides**

- Carbimazole (Néo-mercazole® : cp à 5 mg et à 20 mg).

- Propylthiouracile (PTU = Propylthiouracile AP-HP) : cp à 50 mg.
- Benzylthiouracile (Basdène® : cp à 25 mg).

**Mode d'action**

- Tous agissent par inhibition enzymatique (inhibition de la peroxydase) et bloquent l'organification de l'iode. Ils n'empêchent pas la sécrétion des hormones thyroïdiennes déjà synthétisées et un délai de dix à quinze jours est nécessaire à leur action.
- En outre, le propylthiouracile inhibe la monodéiodase et la transformation périphérique de T4 en T3.

**Posologies habituelles**

Doses d'attaque : 40 à 60 mg/j de Néo-mercazole® ou 400 à 600 mg/j de PTU (dix fois moins actif) maintenues pendant un mois, puis doses dégressives, ou maintien de fortes doses avec adjonction secondaire de T4, pour éviter une hypothyroïdie iatrogène et l'augmentation du volume du goitre.

**Effets secondaires**

- Allergies cutanées. Risques d'allergies croisées pour les différents ATS.
- Élévation des enzymes hépatiques.
- Neutropénie.
- Et, surtout, risque d'agranulocytose brutale (d'origine immunoallergique), rare (0,1 % de tous les traitements), réversible, mais grave en l'absence de diagnostic : la surveillance de la formule sanguine est nécessaire durant les deux premiers mois de traitement et, surtout, *il est conseillé d'arrêter le traitement, de faire une numération formule sanguine (NFS) et de consulter en cas de fièvre inexpliquée.*

**Iode**

- Sous forme de Lugol fort (solution iodo-iodurée à 5 %) : 60 à 90 gouttes/j en trois prises.
- Bloque la synthèse des hormones thyroïdiennes par saturation. Agit rapidement, mais échappement au bout de quelques semaines (effet Wolff-Chaikoff).
- *N'est plus utilisé* sauf, parfois, en préparation à la thyroïdectomie (raffermirait et diminuerait la vascularisation des goitres).

**Bêtabloquants**

- Traitement adjuvant très utile, en respectant les contre-indications habituelles, y compris l'insuffisance cardiaque (*cf. infra*).
- Sous forme de propranolol (Avlocardyl®), bêtabloquant non cardiosélectif qui, de plus, présente l'intérêt de bloquer la monodéiodase et la transformation périphérique de T4 en T3 : 60 à 120 mg/j.
- Agissent sur la composante sympathique de la thyrotoxicose (les hormones thyroïdiennes augmentent la synthèse des récepteurs aux catécholamines).
- Agissent rapidement et permettent d'attendre l'action des ATS.

**Sédatifs**

- Le repos au calme : arrêt de travail.
- Les neurosédatifs sont utiles dans tous les cas.

Enfin, chez une femme jeune, il faut s'assurer qu'il existe une contraception efficace durant la période de traitement.

■ ***Chirurgie***

Thyroïdectomie subtotale bilatérale, après préparation médicale ayant permis d'obtenir l'euthyroïdie : ATS pendant deux ou trois mois et propranolol une quinzaine de jours avant l'intervention. Le risque de lésions des parathyroïdes ou des nerfs récurrents est minime, mais n'est pas nul.

■ ***Iode radioactif ($^{131}$I, IRA ou radioiode)***

Vise à détruire la thyroïde par irradiation interne. Il s'agit d'un traitement simple, sans danger (les risques de cancérisation secondaire et génétique sont nuls) mais entraînant une *hypothyroïdie secondaire* dans plus de 50 % des cas en quelques années. Le délai d'action est de l'ordre d'un mois. Ce traitement est évidemment contre-indiqué chez la femme enceinte et impossible en cas de saturation iodée. Chez la femme en période d'activité génitale, une contraception efficace est nécessaire pendant six mois après l'irradiation.

Ce traitement comporte le risque d'aggravation d'une ophtalmopathie par lyse des cellules et libération d'antigènes. S'il est quand même choisi, il est préférable d'administrer le radioiode sous couvert d'une corticothérapie par voie générale d'environ un mois.

### b) Conduite du traitement

Aucun traitement de la maladie de Basedow n'est parfait, puisque aucun n'agit sur la cause de la maladie. Après ATS, la rechute survient dans 40 à 60 % des cas, surtout au cours de la première année. La thyroïdectomie obtient environ 70 % de rémission, mais il y existe un risque d'hypothyroïdie définitive ou de récidive en proportions variables selon les équipes. L'iode radioactif entraîne très souvent une hypothyroïdie au bout de quelques années. C'est pourquoi l'attitude thérapeutique varie selon les patients et les habitudes de chacun. En France, l'attitude habituelle, dans les formes non compliquées, est le plus souvent la suivante :

- traitement médical pendant un ou deux ans. Surveillance des hormones thyroïdiennes chaque mois au début, puis tous les trois mois (la TSH peut rester longtemps basse) ;
- si une rechute survient : proposition de traitement radical avec soit chirurgie en cas de gros goitre, soit, surtout, IRA (avant tout indiqué chez les patients âgés ou ayant récidivé après thyroïdectomie) ;
- la chirurgie peut être indiquée d'emblée (après préparation médicale de deux ou trois mois) en cas de nodule froid associé (il y aurait un risque plus important de cancer que sur thyroïde saine).

Aux États-Unis, pour des raisons économiques, l'IRA est souvent utilisé en première intention, quel que soit l'âge du patient.

Dans tous les cas, la surveillance des patients doit être prolongée (dosages de TSH) : des récidives ou une hypothyroïdie peuvent survenir des années après l'épisode initial.

## 2. Nodules toxiques

Les traitements possibles sont la *chirurgie* (exérèse du nodule ou thyroïdectomie totale en cas de GMNT), après préparation médicale courte (il n'y a pas là risque de crise toxique), ou l'*IRA*, souvent préféré chez les patients âgés. Le traitement médical n'a qu'un effet suspensif.

## 3. Thyroïdites

Le traitement de la maladie est le traitement anti-inflammatoire (non stéroïdiens ou corticoïdes : 0,5 mg/kg, puis doses dégressives sur trois mois). Le bref épisode de thyrotoxicose est traité par bêtabloquants.

## 4. Hyperthyroïdies induites par l'iode

En attendant l'élimination spontanée de l'iode (ce qui peut demander des mois lorsqu'il s'agit d'amiodarone), le traitement de l'hyperthyroïdie est difficile car la saturation iodée entrave l'action des ATS. En pratique, on utilise :

- les bêtabloquants (sauf contre-indications) et les sédatifs ;
- les ATS lorsqu'il existe des arguments pour une thyropathie sous-jacente (persistance d'une fixation en scintigraphie) ;
- les corticoïdes sont parfois indiqués lorsqu'il s'agit d'une thyroïdite induite par l'iode (scintigraphie blanche).

## 5. Cas particuliers

### a) Cardiothyréoses

- En cas de troubles du rythme cardiaque sans insuffisance cardiaque, les bêtabloquants sont le traitement symptomatique de choix. Contrairement à une notion classique, le risque thromboembolique existe et *les anticoagulants sont obligatoires*. Il est inutile d'espérer une régularisation définitive du rythme cardiaque en l'absence de guérison de l'hyperthyroïdie.
- En cas d'insuffisance coronaire, les bêtabloquants sont également indiqués.
- En cas d'insuffisance cardiaque, les tonicardiaques, vasodilatateurs et diurétiques sont utiles mais, de manière générale, insuffisamment efficaces à eux seuls. Là aussi, les anticoagulants sont indiqués. Bien que ces insuffisances cardiaques soient classiquement à débit élevé, la prudence doit être de mise dans l'emploi des bêtabloquants qui risquent parfois d'aggraver la déchéance myocardique.

Dans tous les cas, le traitement spécifique de l'hyperthyroïdie est indispensable. Du fait de la gravité de la complication qui réclame un traitement radical et du fait du terrain, on préfère dans la plupart des cas proposer un traitement par iode radioactif après préparation et en attendant sa pleine action sous couvert d'ATS.

### b) Exophtalmie maligne

Le traitement antithyroïdien n'a aucun effet sur l'ophtalmopathie qui n'est pas due à la thyrotoxicose. L'exophtalmie simple ne nécessite que de petits moyens : collyres antiseptiques et protecteurs, port de verres teintés, tête surélevée pour dormir. Les traitements agressifs, justifiés dans les formes graves, ne doivent jamais être employés dans un dessein esthétique. Dans les formes malignes, on dispose des moyens suivants (parmi lesquels aucun n'est constamment efficace) :

- *corticothérapie* à fortes doses (1 à 2 mg/kg/j), puis doses dégressives. Il semble que des bolus de fortes doses de corticoïdes permettent de réduire plus rapidement la posologie orale d'entretien ;
- *radiothérapie rétro-orbitaire*, isolée ou associée à la corticothérapie ;

### b) Troubles congénitaux

- Agénésie thyroïdienne.
- Anomalie de migration de la thyroïde qui reste en position linguale.
- Troubles de l'hormonosynthèse par mutation des gènes codant pour les protéines du thyréocyte : NIS, thyroglobuline, peroxydase. Le syndrome de Pendred associe un goitre avec hypothyroïdie et surdité. Il est dû à une mutation du gène de la pendrine, intervenant dans le transport intracellulaire de l'iode.

### c) Mutation du récepteur de la TSH

Responsable non plus d'une activation constitutive du récepteur comme dans certaines hyperthyroïdies mais de son blocage. Cette affection génétique est exceptionnelle.

### d) Mutations du récepteur aux hormones thyroïdiennes : syndrome de résistance aux hormones thyroïdiennes

Ce syndrome, le plus souvent asymptomatique et découvert lors d'une enquête familiale, peut être responsable d'une hypothyroïdie (avec TSH et T4L élevées) ou d'une hyperthyroïdie quand la résistance hypophysaire est plus importante que celle des tissus périphériques. Il s'agit d'une affection rare transmise sur le mode autosomique récessif.

## 6. Insuffisance thyréotrope

- Elle s'intègre généralement dans le cadre d'une insuffisance antéhypophysaire globale.
- Les signes d'hypothyroïdie sont le plus souvent discrets.
- Les étiologies sont celles des insuffisances hypophysaires et hypothalamiques qui ne seront pas abordées ici.

# B. Signes cliniques

Ils associent :
- des troubles cutanéo-phanériens avec infiltration cutanéo-muqueuse ;
- des signes d'hypométabolisme.

La forme prise pour type de description est celle de l'insuffisance thyroïdienne évoluée, mais, en pratique, les signes cliniques sont souvent beaucoup plus frustes.

## 1. Troubles cutanéo-phanériens et infiltration cutanéo-muqueuse

C'est le myxœdème, qui donne parfois son nom à la maladie.

### a) Infiltration cutanée et sous-cutanée

- Visage arrondi, en pleine lune, avec paupières gonflées, lèvres épaisses, faux œdème élastique comblant les creux sus-claviculaires et axillaires.
- Mains, pieds et doigts boudinés.
- Masses musculaires tendues, sensibles, lentes à se décontracter, parfois pseudo-hypertrophie musculaire, mais il existe une diminution de la force prédominant aux racines. Des myalgies, des crampes, surviennent souvent.
- Paresthésies des doigts dues à l'infiltration du canal carpien.
- Prise de poids modérée due à l'infiltration.

## C. Examens complémentaires

### 1. Conséquences de l'infiltration et de l'hypométabolisme

- Électrocardiogramme (ECG) : bradycardie, microvoltage, aplatissement ou inversion des ondes T dans toutes les dérivations. Des troubles de repolarisation localisés doivent faire suspecter une coronaropathie sous-jacente.
- Radiographie de thorax et échographie cardiaque : cardiomégalie par infiltration du péricarde (péricardites myxœdémateuses, bien tolérées) et/ou du myocarde.
- Anémie souvent macrocytaire (il faut rechercher une maladie de Biermer associée).
- Hypercholestérolémie, parfois hypertriglycéridémie et un dosage de la TSH doit être systématique devant toute hypercholestérolémie.
- Hyponatrémie de *dilution*, qui peut être très profonde.
- Augmentation des enzymes musculaires.

### 2. Confirmation du diagnostic

- TSH augmentée : c'est le meilleur examen de dépistage.
- T4L diminuée de manière plus ou moins importante selon le degré de l'hypothyroïdie.
- Le dosage de la T3L ne présente d'intérêt ni pour le diagnostic ni pour la surveillance.

### 3. Enquête étiologique

- Recherche d'anticorps anti-TPO, antithyroglobuline, TBII. En cas de positivité, on recherche une maladie auto-immune associée : anticorps anti-estomac, anti-surrénaux.
- Échographie thyroïdienne :
  – petite thyroïde atrophique du myxœdème idiopathique ;
  – grosse thyroïde homogène et très hypoéchogène dans la thyroïdite de Hashimoto.
- La scintigraphie thyroïdienne ne doit pas être systématiquement demandée. Elle montrerait :
  – un aspect caractéristique « en damier » en cas de thyroïdite de Hashimoto, l'infiltration lymphocytaire de la glande étant souvent irrégulière ;
  – une hyperfixation dans les hypothyroïdies induites par l'iode ou par trouble congénitaux de l'hormonosynthèse (l'organification de l'iode est bloquée, mais non sa captation).
  Cet examen est surtout utile pour rechercher une thyroïde ectopique dans les hypothyroïdies congénitales.
- Dosage de l'iodurie des 24 heures à la recherche d'une surcharge iodée.

## D. Complications

### 1. Complications cardiovasculaires

- Troubles de conduction par infiltration des voies de conduction, rares et régressifs sous traitement substitutif : blocs de branches, blocs auriculo-ventriculaires.

– il en existe deux formes :
  - neurologique (retard mental, surdi-mutité, hémiplégies irréversibles) quand la carence hormonale *in utero* a été très précoce par carence iodée maternelle majeure,
  - crétinisme hypothyroïdien, avec atteinte cérébrale plus tardive dans la vie *in utero* et la petite enfance.

**b) Diagnostic**

- Dans les pays occidentaux, l'hypothyroïdie est dépistée systématiquement par dosage de la TSH à la naissance.
- En 1988, la prévalence des hypothyroïdies dépistées systématiquement était de 1/3 410 habitants.
- En l'absence de traitement urgent, le tableau clinique est catastrophique :
  – outre les signes d'hypothyroïdie ;
  – retard statural avec nanisme dysharmonieux, aux membres très courts, dysgénésie épiphysaire, retard de l'âge osseux ;
  – débilité sévère, irréversible même si le traitement est mis en route.

### 2. Insuffisance thyréotrope

- Généralement modérée et peu bruyante, sans infiltration cutanéo-muqueuse, elle s'intègre dans le tableau de l'insuffisance antéhypophysaire. Elle est à l'origine de l'hyponatrémie.
- Le taux de T4L diminué contraste avec un taux bas de TSH, ou simplement non augmenté : la constatation d'une T4L basse et d'une TSH normale doit faire rechercher une origine hypothalamo-hypophysaire à l'hypothyroïdie.
- Toutes les causes d'insuffisance hypophysaire ou hypothalamique peuvent en être responsables.

## F. Diagnostic différentiel

Il se pose parfois avec le *syndrome de basse T3*, fréquent : il ne s'agit pas d'une insuffisance thyroïdienne mais d'un mécanisme adaptatif d'épargne énergétique chez les personnes atteintes de maladie sévère aiguë ou chronique, ou chez les personnes âgées. La T3 est diminuée du fait d'une diminution de l'action de la monodéiodase (sous l'effet, en partie, de l'hypercortisolisme adaptatif dans les situations de stress), mais la T4L et la TSH sont normales.
Le *syndrome de basse T3 + basse T4* se rencontre dans les situations encore plus sévères, par inhibition réactionnelle de la sécrétion thyréotrope. Le problème d'une insuffisance thyréotrope organique peut alors se poser, mais le contexte permet de rétablir le diagnostic.

## G. Traitement

### 1. Moyens

**a) L-thyroxine (LT4)**

- La LT4 doit être préférée à la LT3 dont la demi-vie est plus courte et demande plusieurs prises quotidiennes, avec des pics plasmatiques brutaux indésirables.

- La demi-vie de la T4 est de l'ordre de huit jours et une seule prise quotidienne est suffisante.
- Les doses sont fonction du degré de l'hypothyroïdie, du but thérapeutique recherché et du poids du patient (elles vont en général de 75 à 200 µg/j).
- On utilise :
  - Lévothyrox® (cp à 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 et 200 µg) ;
  - L-Thyroxine® (cp à 100 µg, gouttes : 1 goutte = 5 µg, ampoules injectables à 200 µg).

#### b) L-tri-iodothyronine (LT3)

- La LT3 (Cynomel®, cp à 25 µg) n'a qu'une seule indication : remplacement temporaire de la T4 arrêtée un mois avant une scintigraphie corps entier à l'iode 131 (cancers thyroïdiens thyroïdectomisés). Sa demi-vie courte permet de ne l'arrêter que quinze jours avant l'examen.
- Il existe aussi une préparation contenant la LT3 et la LT4 (Euthyral®) : elle est considérée comme sans intérêt puisque la T3 endogène provient de la conversion périphérique de la T4. Il semble cependant que de très petites doses de T3 (bien moindres que celles que contient l'Euthyral®) ajoutées à la T4 obtiennent un meilleur effet thérapeutique que la T4 seule.

### 2. Indications et modalités du traitement

#### a) Sujet jeune indemne d'insuffisance coronaire

La posologie peut être forte d'emblée : 50 à 100 µg de T4, puis augmentation par paliers de 25 µg tous les mois jusqu'à obtention d'une TSH normale.

#### b) Sujet âgé et/ou atteint d'insuffisance coronaire

- Posologie initiale *faible* +++ : 12,5 ou 25 µg de T4. Hospitalisation pour surveillance quotidienne, clinique et ECG, chez les sujets les plus fragiles.
- Association éventuelle à des bêtabloquants cardiosélectifs à posologie faible (la clairance métabolique des médicaments est diminuée), sauf contre-indication en cas d'insuffisance coronaire. Les vasodilatateurs peuvent aussi être utilisés. (Attention à l'accentuation de la bradycardie et de l'hypotension artérielle.)
- Augmentation *lente* de la posologie, par paliers de 12,5 ou 25 µg/mois, après un examen clinique recherchant un angor, un ECG.
- Le but du traitement n'est pas d'obtenir une TSH normale, mais une T4L la plus normale possible. Il ne faut pas insister en cas de mauvaise tolérance.

#### c) Insuffisance surrénale associée (syndrome de Schmidt)

- Il faut commencer par substituer l'insuffisance surrénale, le stress relatif apporté par la substitution thyroïdienne risquant d'entraîner une décompensation.
- En cas d'insuffisance hypophysaire, les deux compensations peuvent être simultanées.

#### d) Hypothyroïdies induites par l'iode et le lithium

- Si le médicament responsable peut être arrêté et l'hypothyroïdie modérée : on attend son élimination sous surveillance (ce qui peut durer des mois après un traitement de Cordarone®).
- Si le médicament ne peut être arrêté : traitement substitutif avec les règles habituelles de prudence.

#### e) Chez l'enfant

Le traitement est une *urgence*. On commence par 10 µg/kg (gouttes). Doses à adapter en fonction des résultats des dosages hormonaux.

#### f) Coma myxœdémateux

- Mesures symptomatiques et de réanimation (*en unité de soins intensifs*) : réchauffement, liberté des voies aériennes, ventilation assistée si besoin, restriction hydrique en cas d'hyponatrémie, antibiothérapie en cas de foyer infectieux.
- L'hydrocortisone en intraveineuse est traditionnellement associée.
- Les doses de T4 sont débattues mais, en général, on utilise des posologies très fortes malgré le risque coronarien : 500 à 1 000 µg de T4 en intraveineuse, relayés par 100 à 200 µg/j PO ou par sonde gastrique.

### 3. Surveillance

- Surveillance essentiellement clinique au début : poids, asthénie, tolérance coronarienne, ECG systématique avant chaque augmentation des doses chez les sujets fragiles.
- Dosages de TSH et de T4L toutes les quatre à six semaines tant que la posologie définitive n'est pas établie. Des dosages plus fréquents sont inutiles, une hormonémie stable n'étant pas obtenue avant un mois.
- Une fois le traitement d'entretien établi : dosage annuel de TSH (ou de T4L s'il a été décidé de ne pas normaliser la TSH).

# V. Anomalies morphologiques de la thyroïde : les goitres

## A. Définitions

- Un *goitre* est une hypertrophie de la glande thyroïde, quelle qu'en soit la nature.
- Un *goitre « simple »* est une hypertrophie du corps thyroïde, de nature bénigne, non inflammatoire, sans dysthyroïdie : les cancers, thyroïdites, hyper- et hypothyroïdies sont donc exclus de cette définition, mais ces affections s'accompagnent généralement de goitre (*voir ces différentes pathologies*) et peuvent compliquer un goitre « simple ».

## B. Épidémiologie

- Il s'agit d'une affection extrêmement fréquente et le goitre « simple » est la pathologie endocrinienne la plus répandue dans le monde. Son incidence augmente avec l'âge et il existe une forte prépondérance féminine à partir de la puberté.
- Selon la prévalence du goitre dans la population, on parle de :
  - *Goitre endémique*, lorsque plus de 10 % de la population âgée de 6 à 12 ans est atteinte. De nombreux pays sont touchés, surtout les régions montagneuses : Himalaya, cordillère des Andes, Afrique centrale, mais aussi l'Europe (97 millions de goitreux en 1992 : Europe de l'Est, centrale et du Sud et, dans notre pays, Alpes, Pyrénées, Centre). En France, une enquête nationale réalisée dans les écoles en 1986 a rapporté une prévalence globale de 16,7 % avec d'importantes disparités selon les régions.
  - *Goitre sporadique* : par définition, moins de 10 % de la population considérée est atteinte (surtout le sexe féminin). Ces goitres ont un caractère familial très fréquent.

## C. Classification

### 1. Clinique

L'OMS (Organisation mondiale pour la santé), en 1974, a proposé la classification clinique suivante, approximative mais utile pour les enquêtes épidémiologiques :
- stade 0-a : pas de goitre ;
- stade 0-b : goitre uniquement palpable, non visible le cou en hyperextension ;
- stade I : goitre palpable et visible seulement en hyperextension ;
- stade II : goitre visible le cou en position normale ;
- stade III : très gros goitre visible à distance.

### 2. Anatomopathologique

La formation d'un goitre peut parcourir plusieurs stades ou en rester à l'un d'entre eux. Par ordre théorique d'apparition, on trouve :
- *goitre diffus*, de structure homogène, pouvant être réversible :
  - *parenchymateux*, surtout rencontré chez l'enfant : multiplication des vésicules contenant peu ou pas de colloïde,
  - *colloïde*, avec vésicules de grande dimension remplies de colloïde ;
- *goitre nodulaire*, constitué après plusieurs années d'évolution, non réversible :
  - *goitre nodulaire hyperplasique*, avec multiples micronodules (moins de 1 cm),
  - *goitre nodulaire parenchymateux*, avec nodules allant de quelques millimètres à plusieurs centimètres par prolifération des cellules vésiculaires, entourés d'une capsule fibreuse,
  - *goitre nodulaire colloïde* : multiples nodules non encapsulés, mal limités.

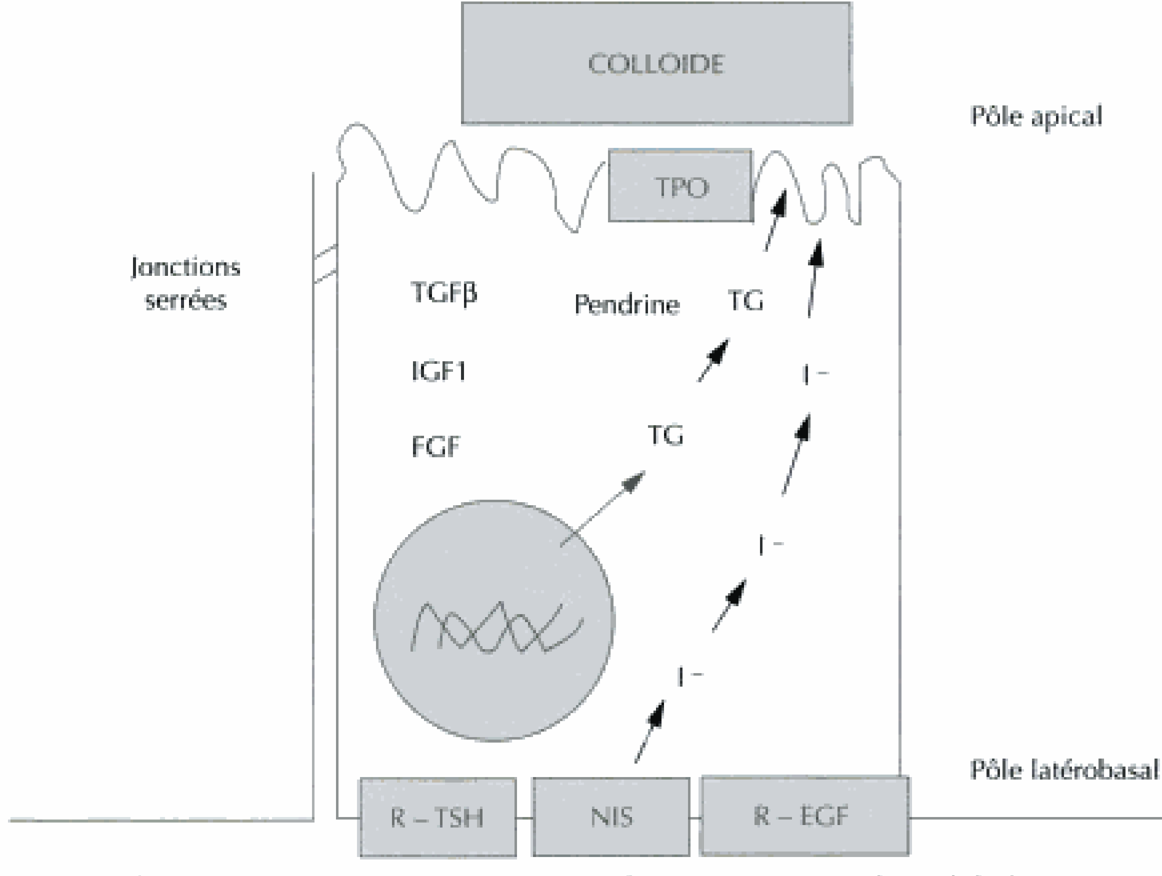
Ces goitres nodulaires sont le siège de remaniements secondaires :
- hémorragies ;
- nécrose avec aspects pseudokystiques ;
- macrocalcifications dont la présence témoigne du caractère ancien du goitre.

# D. Étiologie, physiopathologie

## 1. Goitrogenèse

Toute situation réalisant une entrave au fonctionnement normal de la thyroïde peut entraîner une hypertrophie compensatrice de la glande :

- *la stimulation par la TSH* est le premier facteur invoqué. Néanmoins, il n'existe pas toujours de corrélation entre le taux de TSH et le volume de la glande, et des goitres peuvent continuer à progresser malgré l'administration d'hormones thyroïdiennes qui freinent la TSH ;
- d'*autres facteurs de croissance* sont donc possiblement impliqués : EGF (*epidermal growth factor*), IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*), interleukine 1 (IL-1), anticorps stimulant le récepteur de la TSH (TGI, *thyroid growth immunoglobulins*, dont l'existence est actuellement contestée), mutations du R-TSH (récepteur de l'hormone thyréotrope), possibles, non démontrées à l'heure actuelle *(fig. 2)* ;
- la tendance naturelle de la thyroïde normale est d'évoluer vers la dystrophie : au sein d'un même follicule thyroïdien, certaines cellules ont un pouvoir de réplication plus important que d'autres. Si ces cellules ont un équipement important en enzymes, elles vont produire des nodules « chauds », sinon des nodules « froids » ;




TSH et son récepteur (R-TSH) ; NIS : symporteur iode/potassium ; TG : thyroglobuline ; TPO : thyroperoxydase ; facteurs de croissance : TGFβ : *transforming growth factor β* ; IGF1 : *insuline growth factor 1* ; FGF : *fibroblast growth factor* ; EGF : *epidermal growth factor* et son récepteur (R-EGF).

**Figure 2.** Le thyréocyte. Principales protéines impliquées dans la synthèse des hormones thyroïdiennes et dans la croissance de la glande

- enfin, la surstimulation chronique de la glande avec, en particulier, activation du système générateur d'$H_2O_2$ peut conduire à des mutations somatiques d'un ou plusieurs groupes cellulaires au niveau de leur croissance (modules) et/ou de leur activité (modules toxiques).

## 2. Facteurs goitrogènes

### a) Carence iodée

C'est la première cause de *goitre endémique*. Dans les zones de grande endémie goitreuse, l'iodurie des 24 heures est effondrée et la supplémentation en iode diminue l'incidence du goitre. Dans les régions où elle est > 100 µg/24 h, la prévalence du goitre est faible.

### b) Substances goitrogènes

Dues à des *thiocyanates*, qui inhibent la captation de l'iode, son organification et le couplage des iodothyrosines :
- végétaux du genre *Brassicae* : choux, navet, rutabaga, crucifères nourrissant les vaches (épidémies de goitres en Finlande dues au lait) ;
- manioc, soja, millet, sorgho (qui nourrissent les populations exposées de plus à une grande carence iodée) ;
- lentilles, oignons, ail ;
- eau de boisson, pouvant contenir des substances polluantes antithyroïdiennes : résorcinol, phtalates, disulfides organiques ;
- le tabac.

### c) Médicaments

- Antithyroïdiens de synthèse.
- Lithium.
- O-piprine-DDD (Op'DDD), résorcine, PAS.

### d) Troubles incomplets de l'hormonosynthèse par déficit enzymatique

### e) Facteurs génétiques

- Concordance entre vrais jumeaux : 40 %.
- Par troubles de l'hormonosynthèse dus à des mutations génomiques (pendrine, NIS, thyroglobuline) qui n'entraînent pas toujours une insuffisance thyroïdienne associée.

### f) Physiologiques

Un goitre est fréquent dans des périodes où le besoin en synthèse d'hormones thyroïdiennes est augmenté :
- puberté ;
- grossesse, allaitement (cela explique peut-être en partie la prépondérance féminine de l'affection).

### a) Dosages

- *TSH* : en cas d'anomalie, on complète le bilan par une mesure de la T4 libre pour préciser le degré d'hyper- ou d'hypothyroïdie.
- *Recherche d'anticorps* anti-TPO et antithyroglobuline : la thyroïdite de Hashimoto se manifeste typiquement par un goitre ferme, ligneux, avec hypothyroïdie, mais l'euthyroïdie est possible, voire l'hyperthyroïdie.
- *VS* en cas de goitre douloureux avec fièvre (thyroïdite ?).
- *Iodurie* des 24 heures : examen sans intérêt à titre individuel sauf pour rechercher une hyperthyroïdie induite par l'iode, il est utile dans les enquêtes épidémiologiques.
- *Thyroglobuline* : sans intérêt (son taux est proportionnel à la taille du goitre et à son activité).

### b) Échographie thyroïdienne

Toujours utile.

- Elle précise :
  - le volume du goitre ;
  - son caractère nodulaire ou homogène ;
  - le contenu d'éventuels nodules (liquidiens, tissulaires) ;
  - l'existence d'adénopathies non décelées cliniquement.
- Elle sert d'examen de référence pour la surveillance.

### c) Radiographie cervicale, radiographie de thorax de face, transit œsophagien

En cas de goitre volumineux ou plongeant : recherche d'une déviation et/ou d'une compression de la trachée, de l'œsophage ; limite inférieure du goitre dans le médiastin.

### d) Scanner ou IRM cervico-médiastinal

Seulement en cas de gros goitre plongeant, à la recherche de compression.

### e) Scintigraphie ($^{123}$I ou $^{99}$Tc)

Utile seulement en cas de :

- hyperthyroïdie : fixation diffuse (Basedow) ou fixation exclusive au niveau d'un nodule (adénome toxique) ou de plusieurs (goitre multinodulaire toxique) ;
- nodules tissulaires à l'échographie : repérage des nodules chauds et froids, ces derniers devant être particulièrement surveillés.

### f) Ponction à l'aiguille fine

- Pour évacuer un kyste.
- Pour faire une analyse cytologique d'un nodule froid.

## F. Complications

### 1. Dysthyroïdies

#### a) Hyperthyroïdie

- Basedowienne : elle peut survenir sur goitre préexistant. Dans ce cas, il existe une fixation diffuse en scintigraphie, une présence de TBII (*voir ce chapitre*).

### d) Mutations

- De nombreuses mutations somatiques ont été trouvées dans les cancers thyroïdiens différenciés, mais aussi dans des adénomes bénins : protéines Ras, Ret, $G_S\alpha$ et $G_I\alpha$, récepteur de la TSH, etc., mais la ou les mutations responsables de la formation des cancers thyroïdiens banals n'ont pas encore été identifiées.
- Dans les nombreux cancers thyroïdiens de l'enfant apparus après une irradiation massive (cas de Tchernobyl), il a été trouvé un réarrangement du proto-oncogène Ret.
- Dans les cancers anaplasiques (mais pas les K différenciés), qui dérivent de cancers vésiculaires passés inaperçus, il existe une très haute prévalence de mutation du gène suppresseur de tumeurs p53.
- Les formes familiales de cancer médullaire, isolé ou s'intégrant dans le cadre des néoplasies endocriniennes multiples de type 2 (NEM 2), sont dues à des mutations germinales du proto-oncogène Ret situé dans la région centromérique du chromosome 10 et la recherche de ces mutations fait désormais partie de l'enquête familiale.

### e) Facteurs génétiques

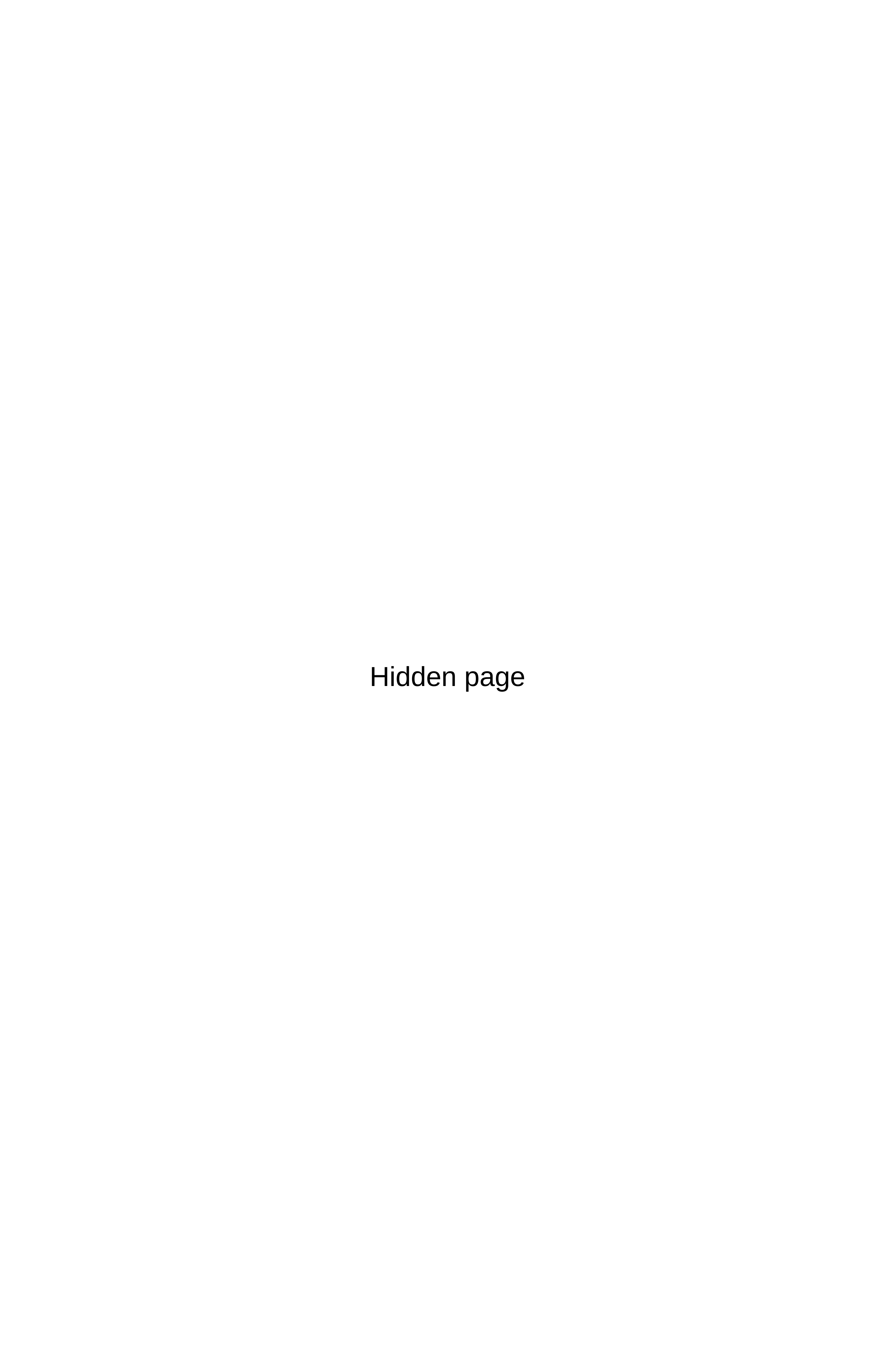
- Trente pour cent des cancers médullaires de la thyroïde sont génétiquement transmis et la découverte d'un tel cancer impose la recherche d'une mutation Ret et une enquête familiale.
- Pour les cancers dérivés des cellules vésiculaires, l'influence génétique est beaucoup moins forte mais existe, et des familles atteintes de cancer papillaire (et de nodules bénins) ont été décrites. La recherche du ou des gènes de susceptibilité est en cours.
- Les cancers papillaires s'intègrent au cadre de certaines maladies génétiques comme la polyadénomatose familiale (syndrome de Gardner).

## 3. Particularités anatomiques, cliniques et évolutives

### a) Cancers thyroïdiens différenciés dérivés des cellules vésiculaires

#### ■ *Cancers papillaires*

- Ce sont les cancers thyroïdiens les plus fréquents (environ 70 %).
- La lésion histologique fondamentale est la végétation papillaire, avec microcalcifications fréquentes.
- Ces cancers sont volontiers multicentriques. Leur croissance est lente.
- Leur drainage est surtout lymphatique et les métastases ganglionnaires sont fréquentes. Les métastases systémiques sont plus rares (poumon).
- Ils sont souvent très différenciés et un ganglion envahi peut passer pour une « thyroïde aberrante ».
- Ils touchent surtout les sujets d'âge moyen (médiane : 45 ans) mais peuvent se voir chez l'enfant ou le sujet âgé. Ils sont deux à trois plus fréquents chez les femmes que chez les hommes.
- Leur pronostic est bon, surtout chez le sujet jeune (plus de 95 % de survie à 20 ans).


Hidden page

- Elle complète la chirurgie en *détruisant les résidus thyroïdiens persistants* malgré une thyroïdectomie apparemment totale, et permet de réaliser une *scintigraphie du corps entier* pour dépister des métastases.

■ *Hormonothérapie thyroïdienne*

Elle vise à compenser l'insuffisance thyroïdienne, mais aussi à freiner la TSH car ces cancers sont TSH dépendants. Les posologies de thyroxine employées (2,5 µg/kg en général) sont celles qui permettent d'obtenir un taux de TSH bas sans créer d'hyperthyroïdie. Sauf en cas de métastases, on se contente actuellement d'un taux de TSH diminué mais non effondré.

■ *Cas particulier des cancers médullaires*

La découverte d'un cancer médullaire de la thyroïde impose la thyroïdectomie totale extracapsulaire, après un bilan d'extension et un bilan hormonal (recherchant en particulier un phéochromocytome). Le curage ganglionnaire central et jugulo-carotidien homolatéral est systématique (consensus). L'hormonothérapie thyroïdienne est instituée en postopératoire immédiat à dose uniquement substitutive. La radiothérapie métabolique par iode 131 n'a aucun intérêt dans cette situation.

### f) Surveillance

■ *Postopératoire*

- Calcémie, examen ORL (recherche d'hypoparathyroïdie ou paralysie récurrentielle iatrogènes).
- Quatre à six semaines après, administration thérapeutique d'iode 131 et scintigraphie du corps entier pour éradiquer les résidus thyroïdiens et dépister d'éventuelles métastases fixant l'iode (*cf. supra*).

■ *À distance* (*fig.* 3)

- Surveillance clinique et dosages de TSH, T4 et T3 libres tous les six mois puis tous les ans.
- Dosage de la *thyroglobuline* tous les six mois puis tous les ans : après thyroïdectomie totale, elle doit être effondrée. La persistance ou la réapparition de concentrations détectables de thyroglobuline est en défaveur de métastases ou de la repousse de tissu thyroïdien. Le dosage de thyroglobuline est plus sensible lorsqu'il est effectué en « défreinage », c'est-à-dire sous stimulation par la TSH endogène après un mois d'arrêt du traitement par T4, mais se pose alors le problème du confort du patient. L'utilisation de TSH recombinante permet d'obtenir une sensibilisation du dosage du traitement sans arrêter le traitement.
- La scintigraphie de détection du corps entier à l'iode 131 (après avoir arrêté le traitement substitutif ou celui sous TSH recombinante pendant un mois) est supplémentée par le dosage de la thyroglobuline. En cas de résultat anormal, on administre une dose thérapeutique d'iode 131 pour détruire une repousse du tissu thyroïdien ou des métastases. Les métastases seront visualisées (écho, scanner, IRM) et enlevées chirurgicalement chaque fois que possible. La répétition des scintigraphies tous les trois à cinq ans n'est plus systématique pour beaucoup d'équipes. Elle n'est refaite qu'en cas d'augmentation de la thyroglobuline et alors, de préférence, à dose thérapeutique qui permet à la fois de mieux visualiser et traiter les métastases.

## 2. Masse thyroïdienne invasive

### a) Interrogatoire

- Notion de masse d'apparition récente ou de goitre ancien ayant rapidement augmenté de volume.
- Signes de compression : dyspnée, dysphagie, modification de la voix, turgescence jugulaire.

### b) Examen clinique

- Le diagnostic de cancer est souvent évident cliniquement devant un goitre très dur, inhomogène, fixé, non mobile à la déglutition, compressif.
- Recherche d'adénopathies.
- Recherche de métastases.

### c) Examens complémentaires

- Radiographies du cou avec index baryté, échographie, scanner des cervicales et du médiastin supérieur à la recherche d'une compression et d'un envahissement des organes de voisinage.
- Radiographies du thorax et scanner thoracique (ou IRM) à la recherche d'un goitre plongeant, d'adénopathies médiastinales, de métastases pleurales ou pulmonaires.
- La scintigraphie montrant de larges plages froides est à peine nécessaire.
- La cytoponction confirme la malignité.

### d) Traitement

- Cancer *différencié* invasif : exérèse aussi large que possible avec curage ganglionnaire, puis irradiation par $^{131}I$ afin de détruire les résidus thyroïdiens et d'éventuelles métastases. Les cures d'IRA doivent être répétées tant que les métastases fixent l'iode et que la tolérance hématologique le permet. Le pronostic n'est pas désespéré dans ces formes différenciées et l'évolution peut être longue.
- Cancer *anaplasique* : le pronostic est catastrophique quelle que soit l'attitude thérapeutique, radiothérapie externe palliative ou chirurgie d'exérèse (qui peut rarement être complète) suivie de radiothérapie. La chimiothérapie est peu efficace.

## 3. Métastases révélatrices

Un cancer thyroïdien peut être découvert à l'occasion de métastases pulmonaires et osseuses. Il peut ne pas être palpable et être détecté seulement par l'échographie. Il peut être révélé par des métastases ganglionnaires. La présence de tissu thyroïdien dans le ganglion signe le cancer et son origine.
Attitude pratique : thyroïdectomie totale, ablation chirurgicale des métastases accessibles et, éventuellement, radiothérapie externe, puis, en cas de cancer différencié, traitement des métastases par l'iode 131.

# C. Conduite à tenir devant un nodule thyroïdien

Affection fréquente : les nodules palpables atteignent 4 à 7 % de la population. Les nodules infracliniques dépistés par échographie ou autopsie sont encore plus fréquents (50 % à 50 ans…).

Dans la grande majorité des cas (90 à 95 %), ils sont bénins, mais la nature d'un nodule tissulaire à l'échographie et hypofixant en scintigraphie ne peut être certaine malgré les progrès apportés par la cytoponction à l'aiguille fine qui permet de mieux cibler les indications et d'opérer de moins en moins de nodules bénins.
Nous décrirons la conduite à tenir devant un nodule de plus de 10 mm de diamètre. Pour les nodules infracentimétriques (micronodules), extrêmement fréquents et à la limite de la physiologie, les explorations sont inutiles, sauf s'il existe une histoire familiale de cancer papillaire ou médullaire.

## 1. Étude clinique

### a) Interrogatoire

- Circonstances de découverte : fortuites le plus souvent, ou gêne cervicale parfois brutale.
- Antécédents personnels (irradiations cervicales) et familiaux (cancer, dystrophie thyroïdienne).
- Ancienneté du nodule, mode évolutif.
- Recherche de signes de compression (rares), de thyroxicose, de diarrhée (elle évoque un CMT).

### b) Examen clinique et signes d'orientation

#### ■ *Examen clinique*

- Local : taille, consistance, régularité, sensibilité, limites, mobilité du nodule, recherche d'autres nodules.
- Régional : recherche poussée d'adénopathies.
- Général : signes de thyrotoxicose ? Douleurs osseuses ?

#### ■ *Signes d'orientation*

Le terme de l'examen clinique permet de recueillir les signes d'orientation. Ils sont :
- rassurants *a priori* : signes de thyrotoxicose, orientant vers un adénome toxique ; nodule bien rond, rénitent, sensible, apparu brutalement – il s'agit probablement d'un kyste. Contrairement à l'opinion ancienne, la découverte d'autres nodules n'est pas un élément rassurant ;
- inquiétants *a priori* :
  - très forte suspicion : *nodule dur, irrégulier, fixé* ; présence *d'adénopathies cervicales, antécédents personnels d'irradiation cervicale, antécédents familiaux de cancer médullaire surtout, ou de cancer papillaire,*
  - suspicion moins forte : âges extrêmes de la vie, sexe masculin (les cancers sont plus fréquents chez les femmes, mais la proportion de cancers parmi les nodules de l'homme est plus forte), nodule d'apparition récente ou ayant augmenté rapidement de volume, taille du nodule supérieure à 3 cm.

*Cependant, rien n'est formel et un nodule d'allure banale peut être un cancer.*

### c) Examens complémentaires

- Dosages :
  - *TSH* +++ dans tous les cas à la recherche d'une thyrotoxicose infraclinique ;



# Hémoglobine

# Hémoglobines : structure et propriétés

V. ANNAIX, Pr A. THUILLIER†
Laboratoire de biochimie, UFR sciences pharmaceutiques et ingénierie de la santé, Angers.

*Les hémoglobines sont des chromoprotéines porphyriniques de coloration rouge renfermant du fer. Contenues dans les globules rouges circulants, ce sont des pigments de transport de l'oxygène, de l'air vers les tissus qui permettent ainsi de surmonter la limitation imposée par la faible solubilité de l'oxygène dans l'eau (0,3 ml pour 100 ml). Ils transportent également du $CO_2$ et des ions $H^+$. Si les hémoglobines se rencontrent dans les hématies des mammifères et des oiseaux, elles sont circulantes chez les autres vertébrés. Les autres chromoprotéines porphyriniques connues sont des transporteurs d'électrons (cytochromes), la vitamine $B_{12}$ ou les pigments de la photosynthèse (chlorophylle).*

# I. Structure

Les hémoglobines possèdent quatre protomères (sous-unités) identiques deux à deux. Les sous-unités sont constituées de l'association d'une chaîne polypeptidique, la globine, et d'un groupement prosthétique, l'hème. Les différences entre hémoglobines portent sur la séquence des chaînes peptidiques, alors que l'hème est identique dans toutes.
Il existe chez l'homme quatre variétés physiologiques d'hémoglobines et de nombreuses formes pathologiques n'ayant pas toutes d'expression clinique. On trouve chez l'adulte un type prédominant, l'hémoglobine A ou $A_0$ (97 à 98 %), et un type mineur, l'hémoglobine $A_2$, représentant 2 à 3 % de l'hémoglobine totale. L'hémoglobine fœtale est appelée « hémoglobine F ». Chaque hématie contient $3.10^8$ molécules d'hémoglobine et il y a environ 150 g d'hémoglobine par litre de sang. Toutes les hémoglobines renferment 0,34 % de fer impliquant une masse moléculaire de 16 500 daltons par atome de fer. La masse moléculaire de l'hémoglobine est d'environ 67 000 daltons.

## A. L'hème

Il résulte de l'association d'une partie organique, la *porphyrine*, et d'un *atome de fer divalent*. La porphyrine est une protoporphyrine de type IX, substituée par quatre radicaux méthyl, deux radicaux vinyl et deux radicaux propanoïque au niveau du noyau porphyne. Ce dernier est une structure cyclique, constituée de l'association de quatre noyaux pyrroles reliés par des ponts méthène (—CH=) (*fig. 1*). L'ensemble de cette molécule insaturée est plan.
L'atome de fer divalent, métal hexacoordinable, est lié par quatre liaisons datives aux atomes d'azote du noyau protoporphyrine. Une cinquième liaison existe entre l'atome de fer et un radical histidine de la chaîne de la globine. La dernière liaison permet le transport d'une molécule d'oxygène.
Lors de la fixation de l'oxygène, des réarrangements électroniques réduisent le volume de l'atome, ce qui permet son introduction dans la couronne de l'hème. En position désoxygénée, la disposition de ses électrons empêche l'atome de fer de s'introduire dans le plan formé par le noyau porphyne (*fig. 2*). Le passage du fer de l'état divalent à l'état trivalent mène à la formation de méthémoglobine, qui ne peut plus fixer l'oxygène.

La *structure secondaire* montre un enroulement sous forme d'hélice α pour 80 % des chaînes polypeptidiques. Les zones non hélicoïdales (au nombre de six) correspondent aux zones de plicature de ces chaînes et déterminent la structure tertiaire caractéristique de la molécule (*fig.* 3).
La chaîne β renferme huit segments hélicoïdaux (A à H). La chaîne α ne comporte que sept segments (A à G). Les acides aminés sont alors repérés par leur numéro dans la chaîne mais aussi par celui qui se trouve dans le segment.

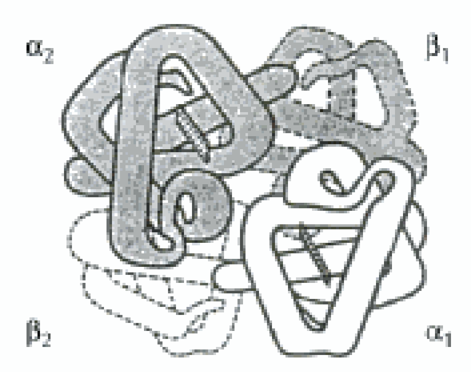



**Figure 3.** Structure quaternaire de l'hémoglobine

La *structure tertiaire* est déterminée par :
- la répartition dans l'espace des segments hélicoïdaux ou non hélicoïdaux ;
- l'enroulement des chaînes permettant la formation d'une poche pouvant accueillir l'hème. Cette région, riche en acides aminés hydrophobes, protège l'hème du contact avec les molécules d'eau et empêche l'oxydation des atomes de fer lors des phénomènes d'oxygénation-désoxygénation.

Au contraire, les résidus polaires prédominent dans une seule région à la surface externe de la molécule et avec une grande variabilité selon les espèces.
La liaison entre chaque hème et une chaîne polypeptidique est assurée par :
- un radical histidine (F8) offrant une liaison au fer lié à l'hème ;
- des liaisons hydrogène avec quelques résidus valine ;
- des forces hydrophobes entre les résidus vinyl du noyau porphyrine et certains résidus leucine tapissant la poche de l'hème.

La zone profonde de chaque protomère est très riche en radicaux non polaires créant une zone favorable à la stabilité. La zone centrale du tétramère, creuse, est tapissée d'acides aminés polaires (lysine) permettant la fixation du 2,3-bisphosphoglycérate (2,3 BPG).

La « *structure quaternaire* » a été mise en évidence par l'analyse des diagrammes de diffraction aux rayons X (Perutz, 1960). Cette protéine possède une conformation sensiblement globulaire d'un diamètre de 55 angströms. Elle est composée de deux parties identiques disposées autour d'un axe de symétrie, chaque chaîne identique étant disposée de façon opposée (*fig.* 3). L'association de ces quatre chaînes est réalisée par des liaisons apolaires (*fig.* 4) :
- les liaisons α1-β1 et α2-β2, de faible énergie mais en grand nombre, sont solides et rigides, grâce à une trentaine d'acides aminés polaires. Ils ne changent pas lors de la fixation de l'oxygène ;
- les contacts α1-β2 et α2-β1 sont moins nombreux, solides mais souples, pouvant se déformer rapidement et permettant une fixation plus rapide de l'oxygène. Ils font intervenir des liaisons hydrophobes ou des ponts hydrogènes.

- l'affinité de l'oxygène pour l'hémoglobine dépend du pH et de la présence du $CO_2$. Elle est également régulée par le 2,3-bisphosphoglycérate (2,3 BPG). Ce sont des effecteurs ou modulateurs allostériques.

## 1. Fixation de l'oxygène par l'hémoglobine

L'hémoglobine assure le transport de l'oxygène des poumons vers les tissus. Une molécule d'oxygène se fixe par atome de fer et 1 g d'hémoglobine peut transporter au maximum 1,34 ml d'oxygène lorsque la saturation est totale, soit environ 20 ml d'oxygène pour 100 ml de sang.

Les courbes d'oxygénation de la myoglobine et de l'hémoglobine montrent que la myoglobine présente une plus grande affinité pour l'oxygène que l'hémoglobine, et ce, à toutes les pressions partielles d'oxygène. Donc, pour toute valeur de $pO_2$, le nombre de sites saturés de la myoglobine est plus important que pour l'hémoglobine (*fig. 6*).

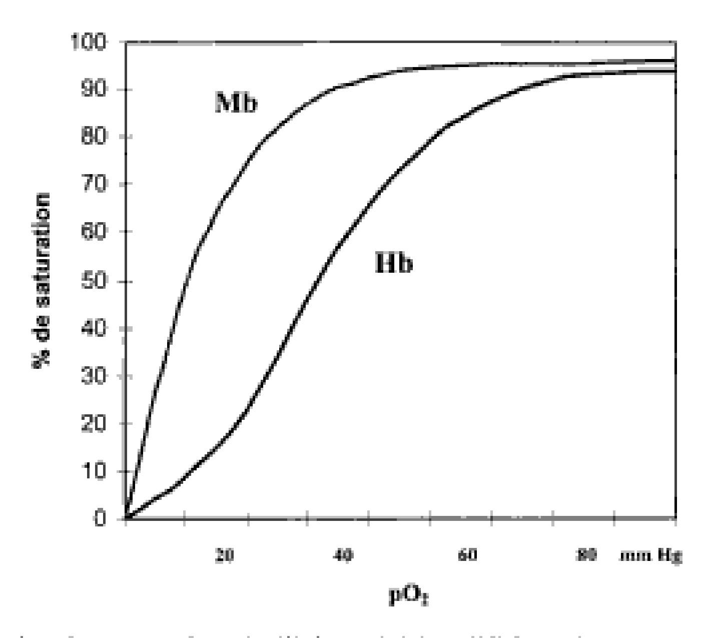



**Figure 6.** Courbe de saturation de l'hémoglobine (Hb) et de la myoglobine (Mb)

La courbe de saturation de l'hémoglobine en fonction de la $pO_2$ présente une allure sigmoïde. D'un point de vue moléculaire, cette fixation est un phénomène coopératif (en relation avec l'allostérie) dû à l'association et au recrutement différent des quatre sous-unités de l'hémoglobine. Le segment initial de la courbe correspond à l'oxygénation de la première sous-unité du tétramère et témoigne d'une faible affinité de celle-ci pour l'oxygène. La pente de la courbe traduit la coopérativité. Le segment terminal de la courbe correspond, quant à lui, à l'oxygénation de la dernière sous-unité et révèle sa forte affinité pour le ligand.

L'oxygène se comporte comme un ligand qui stimule le changement de conformation de chaque sous-unité. La fixation d'une première molécule est relativement lente. L'oxygénation de cette première sous-unité entraîne la fixation d'oxygène successivement sur les autres sous-unités d'une façon autocatalytique. Cette liaison coopérative fait de l'hémoglobine un transporteur plus efficace que la myoglobine, même si l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène est plus faible.

Pour une $pO_2$ de 20 kPa (soit 100 mmHg), correspondant à la pression de l'alvéole pulmonaire, l'hémoglobine est saturée presque complètement (97,5 %). En revanche, au niveau des tissus où la $pO_2$ est voisine de 7 kPa (35 mmHg), l'hémoglobine saturée à 30 % a libéré l'oxygène qui se fixe sur la myoglobine. Dans ces mêmes conditions, la myoglobine saturée ne peut pas le libérer. La combinaison de l'hémoglobine à l'oxygène s'exprime en termes de pourcentage (%) de saturation, soit le rapport de l'oxyhémoglobine à l'hémoglobine totale.
L'équilibre $Hb + O_2 \rightarrow HbO_2$ est régulé par la $pO_2$. L'oxygène sanguin est combiné pour 98,5 % de sa totalité. La faible part restante joue un rôle capital et assure la $pO_2$. L'oxyhémoglobine libère l'oxygène au fur et à mesure que la $pO_2$ diminue.

*De nombreuses modifications de la structure quaternaire apparaissent lors de l'oxygénation.* Lorsque l'hémoglobine se présente sous forme désoxygénée (*fig. 4*), chacune de ses sous-unités se présente sous forme resserrée (forme T). L'hémoglobine affiche alors une cavité centrale réduite au minimum et les extrémités des chaînes β sont réunies par le 2,3 BPG. Cette structure favorise les contacts entre chaînes non homologues et la formation de liaisons salines entre les groupements chargés des acides aminés. Dans cet état, l'atome de fer de chaque groupement prosthétique n'arrive pas à se placer dans le plan horizontal du cycle porphyrinique.
Quand l'hémoglobine est oxygénée, chaque sous-unité est sous forme relâchée (forme R) et son volume est plus important. L'oxygénation d'un fer replace cet atome dans le plan du cycle et attire l'histidine : la liaison est raccourcie par modification électronique. Il se produit également des modifications des liaisons existant autour du fer, ainsi que des mouvements de rotation de l'hème par déplacement des hélices F et G et du segment FG. Ce remaniement structural transforme les zones de contact entre chaînes non homologues et permet à la molécule de passer dans sa forme relâchée R. Il y a rupture des ponts salins et de la liaison avec le 2,3 BPG.
L'interaction entre les sous-unités est donc nécessaire pour l'effet allostérique. Les sous-unités séparées ont une courbe de fixation de l'oxygène peu différente de celle de la myoglobine.

### a) Action du 2,3-bisphosphoglycérate (2,3 BPG)

Ce produit provient d'un intermédiaire de la voie de la glycolyse d'Embden-Meyerhof, l'acide 1,3-bisphosphoglycérique, par action d'une mutase située exclusivement dans le globule rouge. Il est un effecteur allostérique de l'hémoglobine.
Le 2,3 BPG, très anionique, se fixe sous forme d'ester phosphorique à plusieurs résidus (lysine, histidine) des chaînes β au niveau de la cavité centrale et modifie l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène. Le 2,3 BPG forme ainsi un pont entre les deux sous-unités β. Il s'associe à la désoxyhémoglobine et non à la forme oxygénée. Les liaisons de l'oxygène et du 2,3 BPG au niveau de l'hémoglobine sont mutuellement exclusives.
Le 2,3 BPG se fixe donc au niveau des capillaires périphériques et favorise le départ d'oxygène. Il commence à se fixer à l'hémoglobine quand l'oxygène la quitte, ce départ permettant l'accélération de la fixation de 2,3 BPG. Au niveau pulmonaire, le phénomène est inverse : la $pO_2$ élevée permet l'oxygénation de l'hémoglobine et la sortie du 2,3 DPG hors de la cavité centrale devenue trop petite. Quand le

2,3 BPG est fixé, la conformation désoxy- est stabilisée. Inversement, dans l'oxyhémoglobine, la cavité centrale est trop étroite pour l'accès du 2,3 BPG.
La concentration molaire en 2,3 BPG dans les globules rouges est importante et de l'ordre de celle de l'hémoglobine (1 BPG par tétramère). Elle varie cependant dans certaines conditions physiologiques ou pathologiques. Elle augmente par exemple lors des séjours en haute altitude avec diminution concomitante de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène. On observe le même phénomène dans les hypoxies tissulaires.
Il faut remarquer que l'hémoglobine F présente une plus haute affinité pour l'oxygène que celle de l'hémoglobine A : le phénomène est lié à une liaison plus faible avec le 2,3 BPG par la présence d'acides aminés différents dans la cavité centrale (chaîne $\gamma$ au lieu de $\beta$).
Dans le sang conservé pour la transfusion sanguine, le 2,3 BPG tend à disparaître. Il est remplacé par addition au milieu anticoagulant de conservation, de phosphates ou d'inosine nucléoside, qui se métabolise et peut alors s'y substituer.
Le rôle physiologique de ce 2,3 BPG est important : en son absence, l'oxyhémoglobine ne pourrait pas transférer l'oxygène à la myoglobine au niveau tissulaire. Le 2,3 BPG déplace la courbe de saturation de l'hémoglobine par l'oxygène vers la droite.

### b) Rôle du $CO_2$ et des protons : effets Bohr et Haldane

Deux produits du métabolisme tissulaire modifient l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène, donc le pourcentage de saturation : le $CO_2$ et les ions $H^+$, produits du métabolisme aérobie. Le $CO_2$ produit par le métabolisme intermédiaire diffuse du plasma vers les globules rouges. Il est transformé en acide carbonique sous l'action de l'anhydrase carbonique (AC) puis est scindé en bicarbonate et $H^+$ :

$$CO_2 + H_2O \xrightarrow[AC]{} H_2CO_3 \longrightarrow HCO_3^- + H^+$$

Ces protons sont en partie captés par l'hémoglobine. Les $HCO_3^-$ sortent du globule rouge en échange avec des $Cl^-$. Au niveau cellulaire, l'abaissement de pH qui en résulte déplace la courbe de dissociation de l'hémoglobine vers la droite et diminue son affinité pour l'oxygène. Ce phénomène résulterait d'un phénomène allostérique négatif dû aux ions $H^+$ et au $CO_2$. À pH constant, l'augmentation de la concentration en $CO_2$ a le même effet. Ces facteurs exercent surtout leurs effets dans les tissus à $pO_2$ faible.

#### ■ *L'effet Bohr*

L'effet Bohr, par prise en charge de $CO_2$ et abaissement du pH, accroît favorablement la libération d'oxygène dans les tissus métaboliquement actifs, là où l'oxygène est nécessaire.

#### ■ *L'effet Haldane*

L'effet Haldane est le phénomène inverse. Au niveau des capillaires pulmonaires, la fixation d'oxygène sur l'hémoglobine est favorisée par les modifications de l'ionisation et le départ d'ions $H^+$. Par ailleurs, il y a élimination de gaz carbonique, la réaction inverse se déclenche.

## 2. Transport du $CO_2$ dans le sang

Ce mécanisme est important au niveau des hématies circulantes. Après action de l'anhydrase carbonique, la plus grande partie du $CO_2$ total (90 %) est transportée sous forme de bicarbonates et les ions $H^+$ produits sont captés par la désoxyhémoglobine. Une partie du $CO_2$ total (5 % dans le sang veineux) est sous forme dissoute. Le reste du $CO_2$ se combine avec la globine de l'hémoglobine. Des groupements carbamylés avec les fonctions amines N-terminales des chaînes de l'hémoglobine se forment. Les carbamates formés stabilisent la forme T par création de ponts salins. Cette réaction est rapide, facilement réversible et probablement non catalysée. L'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène est diminuée par liaison avec le $CO_2$ qui se lie plus intimement à la désoxyhémoglobine qu'à la forme oxygénée.

## 3. Transport des ions $H^+$

Grâce au groupement imidazole des résidus histidine de la globine – à pH physiologique – l'hémoglobine joue un rôle tampon, variable selon le degré d'oxygénation de la molécule, l'oxyhémoglobine étant un acide plus fort que la désoxyhémoglobine. Ainsi au niveau des poumons où l'hémoglobine est oxygénée, les ions $H^+$ peuvent être libérés dans le milieu. Le phénomène est inverse dans les tissus. Ce système tampon est en étroite relation avec le système tampon bicarbonate : au niveau des poumons, les $H^+$ libérés se combinent avec des $HCO_3^-$ qui libèrent du $CO_2$ expirable.

## 4. Liaison avec l'oxyde de carbone

L'oxyde de carbone (CO) peut se combiner avec l'hémoglobine en occupant alors la place de l'oxygène sur l'atome de fer. Il s'agit d'une combinaison très stable conduisant à la formation de la carboxyhémoglobine (de couleur rouge vif). La courbe de saturation en CO est comparable à celle en $O_2$. Cependant, l'affinité de l'hémoglobine pour CO est deux cents fois plus forte que pour $O_2$.
Chez un sujet sain, le taux de carboxyhémoglobine est inférieur à 4 % de l'hémoglobine totale, un sujet fumeur pouvant avoir des taux légèrement plus élevés. L'intoxication au CO est sournoise : elle induit une anoxémie aiguë dont la gravité dépend de la durée d'exposition et de la quantité de CO inspiré. L'oxygène hyperbare déplace le CO de sa combinaison avec l'hémoglobine et son utilisation constitue le traitement des intoxications à l'oxyde de carbone pour déplacer l'équilibre de liaison.

## 5. Oxydation de l'hémoglobine

L'oxydation du $Fe^{2+}$ de l'hémoglobine en $Fe^{3+}$ produit de la méthémoglobine (de couleur brune), qui ne peut plus fixer l'oxygène. L'ion ferreux est sensible à l'oxydation endogène (radicaux superoxydes, peroxyde d'hydrogène, NO) ou exogène (aliments et toxiques). Le phénomène est physiologique et constant : l'hème est alors appelé « hématine ».
Normalement, chez l'adulte, il existe moins de 1 % de méthémoglobine dans les globules rouges par la présence d'une méthémoglobine réductase à NADH, $H^+$ et

# Biosynthèse et catabolisme de l'hémoglobine

V. ANNAIX, Pr A. THUILLIER[†]
Laboratoire de biochimie, UFR sciences pharmaceutiques et ingénierie de la santé, Angers.

# I. Biosynthèse

La biosynthèse de l'hémoglobine est réalisée chez l'adulte dans les érythroblastes de la moelle osseuse et dans les réticulocytes circulants.
Les précurseurs de l'hémoglobine sont :
- les chaînes polypeptidiques de la globine ;
- la protoporphyrine IX, synthétisée dans les mitochondries cellulaires des tissus ;
- le fer, provenant essentiellement du recyclage interne ;

L'insertion de fer ferreux au centre de la protoporphyrine forme l'hème.

## A. Synthèse des chaînes polypeptidiques de la globine

Voir « *Hémoglobinopathies* » : contrôle génétique de la synthèse de l'hémoglobine.
Comme toute protéine, la globine est synthétisée par :
- transcription : copie, sous forme d'une structure de bases complémentaires, d'une partie de DNA correspondant à un gène de structure et formation d'un ARNm d'abord natif puis fonctionnel par perte des régions non codantes ;
- activation des acides aminés : par fixation des acides aminés cytoplasmiques sur un ARNt spécifique ;
- traduction : elle permet de traduire une séquence de nucléotides en séquence d'acides aminés et comprend trois étapes (initiation, élongation puis libération des chaînes polypeptidiques).

Au cours de la vie (de la période embryonnaire à l'âge adulte), plusieurs types d'hémoglobines apparaissent et se différencient par la nature des chaînes polypeptidiques. Par exemple, pour l'hémoglobine A, la synthèse des chaînes $\alpha$ a lieu en premier, permettant ensuite la libération des chaînes $\beta$ des polysomes. Les chaînes $\alpha$ et $\beta$ synthétisées forment des dimères $\alpha\beta$ qui s'associent en tétramères $\alpha 2\beta 2$.

## B. Synthèse des porphyrines et de l'hème

La synthèse de l'hème se réalise dans tous les tissus. Elle est intense dans la moelle érythropoïétique au niveau des précurseurs des hématies – jusqu'au stade réticulocyte. Les porphyrines sont des substances rouges constituées d'un noyau porphyne, cycle tétrapyrrolique, variable au niveau de ses substituants. Les porphyrines diffèrent par la nature des radicaux portés par les atomes de carbone. Ils peuvent être : méthyl, acétique, vinyl ou propionique. Ainsi les uroporphyrines présentent des substituants acétique et propionique, les coproporphyrines, des substituants méthyl et propionique, et les protoporphyrines, des substituants méthyl, vinyl et propionique. Les différentes combinaisons de répartition de ces substituants induisent la formation de nombreux isomères. D'un point de vue physiologique, seuls les isomères I et surtout III sont retrouvés. Les différentes étapes de la synthèse sont présentées dans les *figures 1* et *2*.

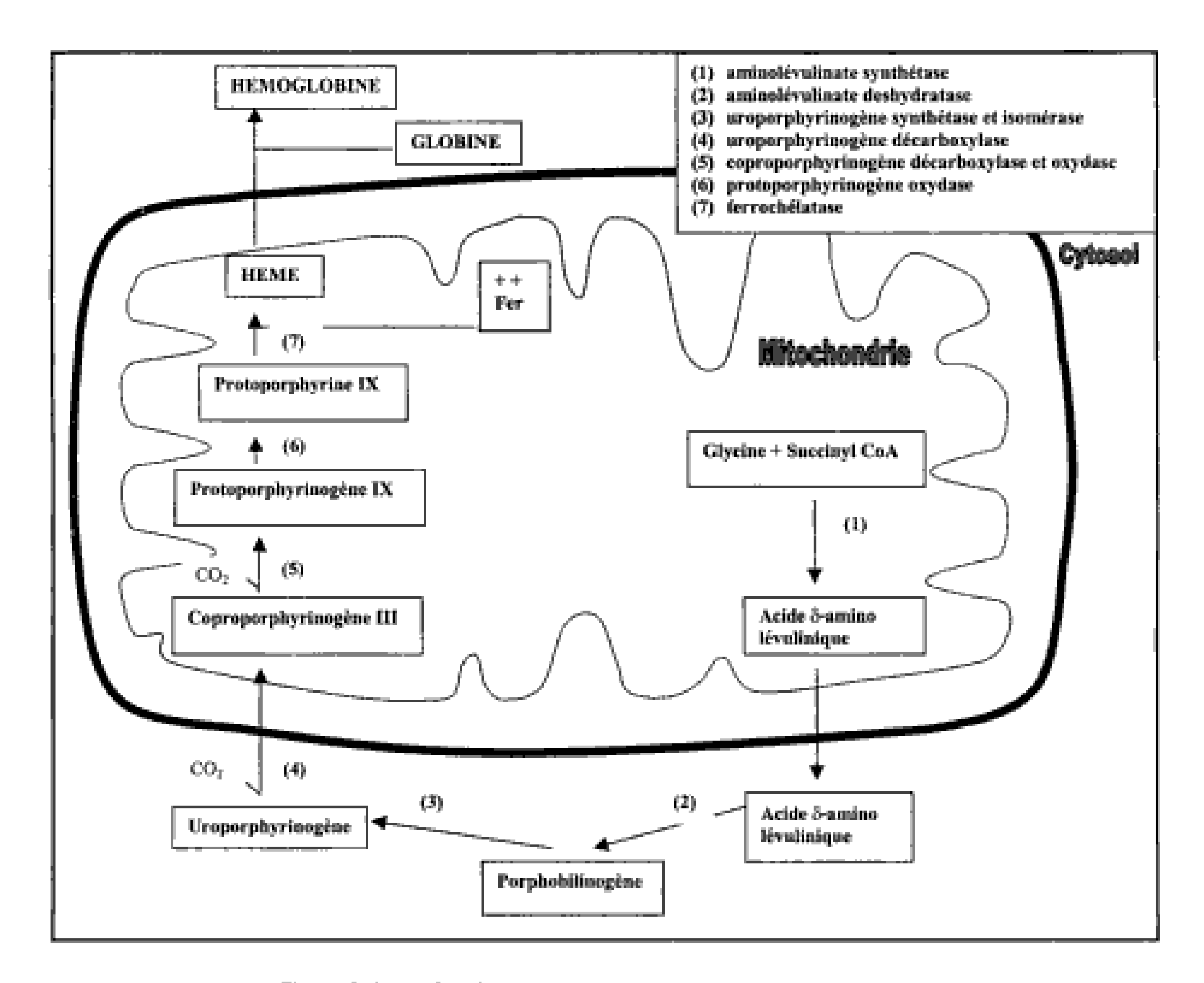



**Figure 2.** Localisation cellulaire de la synthèse de l'hème

### b) Condensation de quatre porphobilinogènes

Elle permet l'apparition des uroporphyrinogènes et nécessite l'action conjuguée de deux systèmes enzymatiques :

- l'uroporphyrinogène synthétase avec formation de dérivés de la série I. Ces composés sont présents physiologiquement à l'état de traces dans les liquides de l'organisme, mais peuvent augmenter dans certaines circonstances pathologiques (porphyries) ;
- l'uroporphyrinogène isomérase permettant l'obtention des dérivés de la série III, seuls composés fonctionnels.

## 3. Étape intramitochondriale

Elle comprend :

- la décarboxylation de l'uroporphyrinogène III en coproporphyrinogène III par transformation des quatre radicaux acétyl en radicaux méthyl ;
- l'oxydation et décarboxylation de deux résidus propanoïque en résidus vinyl et formation de protoporphyrinogène IX ;
- l'oxydation du protoporphyrinogène IX en protoporphyrine X ;

- l'incorporation de fer ($Fe^{2+}$) apolaire au centre de la molécule de protoporphyrine : la formation de l'hème est sous dépendance d'une hème synthétase ou ferrochélatase. Le fer provient essentiellement de la destruction des hématies anciennes ou d'une érythropoïèse inefficace. Il est apporté par la transferrine jusqu'à un récepteur de la membrane cellulaire ou fourni par la ferritine intracellulaire dans les cellules non érythropoïétiques.

### 4. Régulation de cette biosynthèse

Elle est très étroite. En effet, chez un sujet normal, l'élimination par voie urinaire des déchets de cette voie n'est réalisée qu'à l'état de traces, en contraste avec la grande quantité d'hèmes synthétisée chaque jour. Différents facteurs participent à cette régulation :

- les synthèses enzymatiques sont réparties entre cytosol et mitochondries et impliquent des phénomènes de transfert d'un secteur à l'autre. Le passage des métabolites à travers la membrane mitochondriale constitue l'un des principaux facteurs de régulation ;
- lors de la première étape limitante, la δ-aminolévulinate synthétase est une enzyme allostérique ayant l'hème pour effecteur négatif. Ce phénomène est majeur dans les cellules non érythropoïétiques ;
- l'hème déprime également la biosynthèse des enzymes nécessaires à sa production. Leur biosynthèse est en revanche augmentée par certains corticoïdes ;
- dans les cellules érythropoïétiques, le fer est activateur de la biosynthèse.

## C. Hémoglobinogenèse et facteurs l'influençant

Dans les cellules érythropoïétiques, l'hème sort des mitochondries et se combine à la globine pour former l'hémoglobine au niveau du réticulum endoplasmique. Une quantité d'hème libre est présente dans le cytoplasme. Dans les cellules non érythropoïétiques, l'hème formé se conjugue avec des protéines pour former des cytochromes dont certains gagnent le cytoplasme. Les biosynthèses de l'hème et de la globine sont bien coordonnées :

- l'hème lève l'inhibition qui pèse sur la biosynthèse des chaînes α et β, en agissant au niveau de l'étape d'initiation (facteur eIF2). C'est aussi un régulateur de la traduction des ARNm des chaînes de la globine ;
- la globine, elle, stimule la synthèse de l'hème.

Différents facteurs modifient l'hémoglobinogenèse :

- régulation hormonale : l'érythropoïétine, glycoprotéine synthétisée par les cellules rénales et dont la sécrétion est accrue lors des hypoxies, stimule la transcription ;
- carence protéique : elle freine la synthèse des nucléoprotéines et diminue ainsi la synthèse des chaînes polypeptidiques ;
- carence intracellulaire en fer : elle diminue la synthèse de l'hème par inhibition de la dernière étape enzymatique (ferrochélatase) ;
- acide folique, vitamines $B_{12}$ et $B_6$ interviennent dans la biosynthèse soit de la globine, soit du noyau porphyne.

# Hémoglobinopathies : drépanocytose et thalassémies

V. ANNAIX, Pr A. THUILLIER[†]
Laboratoire de biochimie, UFR sciences pharmaceutiques et ingénierie de la santé, Angers.

*Les hémoglobinopathies résultent d'anomalies sur les chaînes de la globine et se divisent en deux groupes : les hémoglobinoses par anomalies de structure (synthèse de variants d'hémoglobine) et les thalassémies par anomalies de synthèse. Potentiellement graves, ce sont les affections génétiques les plus fréquentes au monde. Elles constituent un problème de santé publique. Les circonstances d'étude des hémoglobines au laboratoire sont multiples. Elles sont en général recherchées consécutivement à la présence de signes cliniques d'appel : anémie, ictère à bilirubine libre par hémolyse corpusculaire, cyanose, hépatomégalie. Elles sont le plus souvent mises en évidence dans des populations à risque, essentiellement des sujets provenant des régions tropicales du globe, du bassin méditerranéen ou du Moyen-Orient. Il existe une certaine répartition géographique dans les ethnies touchées, mais elles se rencontrent de plus en plus souvent dans les pays d'Europe du Nord en raison des mouvements de population.*
*La plupart du temps, un examen hématologique de routine (numération globulaire, VGM) révèle une anémie normocytaire ou microcytaire hypochrome avec anomalies de taille, de forme ou de coloration des hématies, ou quelquefois une polyglobulie (pseudopolyglobulie microcytaire), l'ensemble de ces éléments faisant évoquer une hémoglobinopathie. Ces pathologies peuvent également être détectées lors du dosage des hémoglobines glyquées dans le cadre de la surveillance du diabète. Leur diagnostic de première intention repose principalement sur un dosage du fer sérique, de l'hémoglobine, associé à une technique séparative des hémoglobines. Il est parfois nécessaire de réaliser des examens complémentaires (électrophorèse en milieu acide, dosage des différentes fractions) afin de préciser la nature de l'anomalie. En France, des dépistages ciblés néonataux (drépanocytose, 1996) ou prénataux sont proposés.*

# I. Rappels sur la structure et le rôle des hémoglobines normales rencontrées chez l'homme

- Structure et fonctions de l'hémoglobine.
- Hémoglobines physiologiques au cours de la vie.

Voir « *Hémoglobines, structure et propriétés* » et « *Biosynthèse et catabolisme de l'hémoglobine* »

# II. Contrôle génétique de la synthèse de l'hémoglobine

La connaissance des gènes codant pour les chaînes de l'hémoglobine est acquise par :
- des études familiales et des techniques d'hybridation cellulaire permettant la localisation chromosomique de certains gènes ;
- le clonage de ces gènes permettant l'étude de leur séquence et de leur expression.

Ces études sont aisément réalisables grâce à la facilité d'obtention de l'hémoglobine à l'état pur chez de nombreux sujets porteurs d'anomalies de l'hémoglobine. Actuellement, plus de 900 variants sont décrits.

Chez l'homme, les *gènes de l'hémoglobine* se répartissent en deux groupes distincts :
- le groupe des gènes de type α ;
- le groupe des gènes de type β.

La structure de tous les gènes de globine est similaire : chacun est formé de deux introns (régions non codantes) et de trois exons (régions codantes). La région transcrite est précédée d'un promoteur (boîtes TATAA et CCAAT) et de séquences régulatrices en amont qui synchronisent l'expression des gènes des différentes globines en fonction des cellules érythropoïétiques. Toutes les hémoglobines humaines sont des tétramères associant deux sous-unités du type α et deux autres du type β. Physiologiquement, il y a toujours équilibre de synthèse entre les chaînes α et β de globine.

## A. Groupe des gènes de type α *(fig. 1)*

Il est localisé sur le bras court du chromosome 16. Il comprend, de 3' à 5' (sur une petite séquence de DNA de 30 Kb) :
- deux gènes de structure α1 et α2, fonctionnels dès la vie embryonnaire ;
- un gène de structure ζ permettant la formation des chaînes ζ (qui remplacent les chaînes α au cours des premières semaines de la vie embryonnaire).

Chez un sujet normal, les gènes α1 et α2 sont dupliqués. Il existe donc quatre gènes de structure α pour une paire de chromosomes. En revanche, les gènes α2 sont trois fois plus exprimés que les gènes α1. Lors de l'étude des mutants structuraux des chaînes α, l'hémoglobine anormale peut donc représenter de 25 à 100 % de l'hémoglobine totale.

## B. Groupe des gènes de type β *(fig. 1)*

Il est localisé sur le bras court du chromosome 11 (dans un fragment de DNA de 60 Kb) et il comprend de 3' vers 5' :
- un gène β, dont l'expression débute à la fin du premier trimestre de gestation ;
- un gène δ, fonctionnel après la naissance ;
- deux gènes γA et γG qui diffèrent par la variation d'un acide aminé en position 136 de la chaîne fœtale (glycine ou alanine) ;
- un gène ε embryonnaire.

Le gène β n'est pas dupliqué, contrairement aux gènes α. Les lésions qui touchent les gènes β s'expriment :
- pour 50 % de l'hémoglobine totale si un seul gène est atteint ;
- pour 100 % de l'hémoglobine totale si aucun des deux gènes n'est fonctionnel.

En conséquence, la plupart des lésions qui portent sur les gènes β sont plus sévères que celles qui atteignent les gènes α.

Il existe une différence considérable d'expression quantitative entre les gènes β permettant la synthèse des chaînes β de l'hémoglobine A (97 ou 98 %) et les gènes δ permettant celle des chaînes δ de l'hémoglobine A2 (2 ou 3 %).

Pour chacun des groupes de gènes (α ou β), il est possible de mettre en évidence des pseudogènes qui représentent des analogies avec les gènes du groupe considéré mais qui ne sont pas fonctionnels (en particulier par délétion du triplet d'initiation ou perte des signaux de reconnaissance). Comme dans la plupart des gènes

## IV. Thalassémies : hémoglobinopathies par anomalies génétiques de synthèse des chaînes de la globine

À côté des hémoglobines anormales dans leur structure primaire, il existe un deuxième groupe majeur d'hémoglobinopathies caractérisées par un désordre héréditaire de la synthèse d'une ou plusieurs sous-unités de l'hémoglobine. Il est alors possible de mettre en évidence une diminution du taux de synthèse d'une ou plusieurs chaînes de la globine (surtout $\alpha$ ou $\beta$). Ces hémoglobinopathies sont le plus souvent rencontrées chez des sujets d'origine méditerranéenne, mais aussi aux Moyen- et Extrême-Orient, et en Afrique.
Il s'agit d'un *groupe hétérogène* comprenant deux grandes catégories d'anomalies selon que le déficit porte sur la chaine $\beta$ ou $\alpha$ de l'hémoglobine : les $\beta$-thalassémies et les $\alpha$-thalassémies. Du fait de la commutation progressive $\gamma \rightarrow \beta$, les $\beta$-thalassémies ne s'expriment qu'après la naissance, alors que la $\alpha$-thalassémies le font dès la vie fœtale. Ces syndromes thalassémiques sont classés en traits ($\alpha$+ ou $\beta$+) et thalassémies ($\alpha^{\circ}$ ou $\beta^{\circ}$) selon que la synthèse protéique ($\alpha$ ou $\beta$) est diminuée ou absente, par modification du taux d'ARN transcrits. Les troubles cliniques et hématologiques observés lors des thalassémies varient selon l'importance du déficit. Ils sont la conséquence du défaut de production d'hémoglobine par défaut de synthèse des chaînes. Ces troubles sont discrets chez le sujet hétérozygote mais toujours très graves chez l'homozygote. Un taux intraérythrocytaire en hémoglobine TCMH inférieur à 27 pg doit alerter et faire rechercher ces anomalies.

### A. $\beta$-thalassémies

Deux cents lésions moléculaires sont actuellement décrites. Elles correspondent à des mutations ponctuelles touchant un ou deux gènes $\beta$, plus rarement des délétions. Elles se traduisent par :
- une diminution de synthèse de $\beta$-globine ($\beta^{+}$ thal), conséquence des anomalies de maturation des ARNm, de promoteur avec diminution de l'efficacité transcriptionnelle ;
- ou une absence totale ($\beta^{\circ}$ thal) de synthèse de $\beta$-globine à la suite de mutations non-sens, décalantes, une anomalie de la séquence signal de polyadénylation, un épissage anormal ou des délétions.

Elles s'observent essentiellement dans le bassin méditerranéen, en Asie et en Afrique.

#### 1. Forme homozygote ou thalassémie majeure

Décrite sous le nom d'« anémie de Cooley » ($\beta^{\circ}$ thal) en 1925. Les *signes cliniques* débutent entre les troisième et sixième mois de la vie et se manifestent par une hépatosplénomégalie, un ictère (à bilirubine libre), un retard staturopondéral, une modification du squelette et une insuffisance cardiaque. Ces enfants ne présentent pas d'anémie à la naissance. Les cellules érythropoïétiques médullaires ne subissent pas après la naissance la répression au niveau du gène $\gamma$ et synthétisent l'hémoglobine F ($\alpha2\gamma2$), la synthèse d'HbA2 étant possible ($\alpha2\delta2$).

Les *signes biologiques* des β-thalassémies sont très marqués, avec anémie majeure (par érythropoïèse inefficace et hémolyse) et érythroblastose (médullaire et périphérique). La réponse à l'érythropoïétine entraîne l'hyperplasie médullaire, se traduisant par les déformations du squelette. L'hémolyse est la conséquence de l'insolubilité des chaînes α qui provoquent une altération membranaire de l'hématie. Le défaut de production d'hémoglobine entraîne une anémie microcytaire hypochrome. Sur frottis sanguin, il est possible de détecter des hématies anormales quant à leur morphologie (anisocytose, poïkilocytose, etc.) et des cellules cibles (par précipitation des chaînes α non associées). Les techniques séparatives révèlent une proportion anormale des différentes chaînes avec hémoglobine F en quantité majoritaire et hémoglobine A2 en pourcentage variable, par rapport à l'hémoglobine A absente.
Le *traitement* de cette affection grave comprend des transfusions régulières avec administration de chélateurs du fer et splénectomie si une greffe n'est pas envisageable. Ces enfants présentent une surcharge en fer par un mécanisme double : hyperabsorption digestive et transfusions. Le pronostic est fatal le plus souvent entre 20 et 30 ans, par hémochromatose secondaire dès 10 ou 12 ans. La prévention repose sur le diagnostic prénatal.

## 2. β-thalassémies hétérozygotes

Cent fois plus fréquentes que la forme homozygote, elles sont d'expression clinicobiologique variable et se manifestent entre 3 et 10 ans avec splénomégalie. Dans chaque hématie microcytaire, la quantité d'hémoglobine est diminuée mais l'anémie n'est pas toujours présente. Les sujets peuvent donc présenter :
- soit une polyglobulie microcytaire hypochrome avec un fer sérique normal ;
- soit une anémie hypochrome hypersidérémique avec ictère à bilirubine libre.

Par CLHP, il est détecté une augmentation du taux d'hémoglobine A2 (> 3,5 %) avec augmentation inconstante d'hémoglobine F (2 à 5 %). D'évolution bénigne en général, elles ne requièrent aucun traitement.

## 3. Cas particuliers à rattacher aux β-thalassémies

Les augmentations d'hémoglobine F chez l'adulte doivent faire rechercher la persistance héréditaire en hémoglobine F et les δβ-thalassémies. Ces pathologies sont surtout consécutives à des délétions.

### a) Persistance héréditaire en hémoglobine F (PHHF)

L'absence ou la diminution de synthèse des chaînes β induit en compensation une augmentation de synthèse des chaînes γ. La PHHF est décrite surtout au sein de l'ethnie noire, mais également en Grèce. Elle présente les signes d'une β-thalassémie mais sans manifestations cliniques (pas d'anémie ni d'hémolyse). La synthèse des chaînes β et δ est diminuée à des degrés variables. Cependant, la synthèse en compensation de chaînes γ est suffisante. Plusieurs formes sont décrites en fonction du degré de dépression de la synthèse des chaînes β et δ et du taux d'hémoglobine F (de 20 à 100 % chez le sujet homozygote).

**b) δβ-thalassémies**

Selon l'étendue des délétions, elles comprennent :

- un groupe produisant des chaînes γA et γG, dont les hémoglobines Lepore et anti-Lepore. Il s'agit hémoglobines recombinées par crossing-over entre gènes non homologues (β et δ). Se forment alors des chaînes qui sont recombinées codées dans la partie N-terminale par un gène et par un autre dans la partie C-terminale. Il existe des formes homozygotes ou hétérozygotes. Les troubles cliniques et hématologiques sont ceux d'une β-thalassémie. La synthèse d'une hémoglobine recombinée δβ s'accompagne d'un excès apparent des chaînes α. Chez l'homozygote, la synthèse compensatrice de chaînes γ aboutit à la formation d'hémoglobine F. Chez l'hétérozygote, on retrouve 5 à 15 % d'hémoglobine F ;
- un groupe ne produisant que des chaînes γG.

## B. α-thalassémies

Elles sont dues à une anomalie quantitative de la synthèse des chaînes α, surtout par délétion de l'un, des deux, trois ou quatre gènes α, et sont caractérisées, comme les β-thalassémies, par une anémie microcytaire hypochrome hémolytique. Elles affichent cependant une caractéristique particulière puisque la chaîne α est présente dans les différentes hémoglobines normales. Le défaut de synthèse des chaînes α affecte donc les hémoglobines A, A2 et F, ce qui ne modifie pas leurs proportions respectives contrairement aux β-thalassémies. Les chaînes libres synthétisées (β et γ) peuvent s'associer pour donner naissance aux hémoglobines Bart's (γ4) et H (β4). Ces hémoglobines ne sont pas capables d'assurer une oxygénation correcte des tissus. Les aspects cliniques et biologiques dépendent du nombre de gènes atteints. Selon le nombre affecté par la délétion, on distingue, par chromosome, la configuration α+ thal (–α) correspondant à un gène fonctionnel et celle, α° thal (--), dans laquelle aucun gène n'est fonctionnel. Il y a donc quatre phénotypes possibles que nous traiterons par ordre de gravité décroissante.

### 1. Forme homozygote : l'anasarque fœtal ou hydrops fetalis

C'est le syndrome le plus grave, relativement fréquent dans le Sud-Est asiatique. Il induit la mort *in utero* ou très précocement après la naissance. Cette forme correspond à la délétion des quatre gènes α et donc à un déficit total en chaîne α, de génotype α° thal homozygote (--/--). 80 à 90 % de l'hémoglobine détectée est l'hémoglobine Bart's embryonnaire (γ4) et l'hémoglobine H (β4). Il peut même apparaître de l'hémoglobine Portland (ζ2γ2), les hémoglobines A et F étant absentes.

### 2. Formes hétérozygotes

*L'hémoglobinose H* : elle se rencontre fréquemment en Grèce et en Orient et est la traduction de la délétion de *trois gènes α*, dont un seul est fonctionnel (-α/--). Les sujets atteints présentent un syndrome thalassémique dès la naissance, avec ictère chronique, anémie microcytaire hypochrome par hémolyse et splénomégalie. En technique séparative, on peut détecter l'hémoglobine H, qui provient de l'association des chaînes β en

excès pour former un tétramère β4, qui peut représenter jusqu'à 30 % de l'hémoglobine totale. Le constituant majeur détecté demeure cependant l'hémoglobine A. Des traces d'hémoglobine Bart's (γ4) peuvent être mises en évidence (de 20 à 30 % à la naissance). Sur un frottis sanguin, ces tétramères (β4 ou γ4) relativement instables se traduisent par l'apparition d'inclusions intraérythocytaires, ou corps de Heinz.

*Les autres formes hétérozygotes sont la conséquence de la délétion* :

- de *deux gènes*, trait α° thal (αα/--) hétérozygote ou α+ thal (α–/α–) homozygote, thalassémies mineures asymptomatiques (Afrique noire). Dans la plupart des cas, il est détecté une diminution de HbA2, la présence d'une petite quantité d'hémoglobine Bart's à la naissance, associée à une pseudopolyglobulie microcytaire hypochrome ;
- ou d'*un gène* : trait α+ thal hétérozygote, sans manifestations clinicobiologiques (Afrique noire, Méditerranée, Asie).

### 3. Hémoglobinose Constant Spring

L'hémoglobine Constant Spring (Hb CSpr) est caractérisée par un allongement anormal de 31 acides aminés sur la chaîne α. C'est une molécule instable, traduction d'une mutation dans le codon de terminaison. Décrite au départ en Chine, sa transmission est familiale et toujours associée à celle des syndromes α thalassémiques à hémoglobinose H. Cette hémoglobine anormale est alors un constituant mineur (1 ou 2 % du taux d'hémoglobine totale).

## C. Association thalassémies et mutants de chaîne α ou β

Il est possible d'observer des pathologies associant des anomalies qualitatives et quantitatives de la globine. Les anomalies hématologiques sont aggravées ou minorées. Sont ainsi détectables les associations l'hémoglobinose E avec une α- ou une β-thalassémie, fréquente dans le Sud-Est asiatique, et l'association drépanocytose-thalassémie.

# V. Méthodes d'étude des hémoglobinopathies

En pratique courante, le diagnostic d'hémoglobinopathie repose sur des données biologiques associées aux données de l'interrogatoire. Des renseignements précis sont indispensables lors de la demande d'examens biologiques : origine géographique du patient et de ses ascendants, antécédents, clinique, résultats d'un hémogramme récent (Hb, VGM, TCMH, réticulocytes, aspect du frottis sanguin), notion de transfusion ou de traitement martial. L'isolement, l'identification et le dosage des différentes hémoglobines normales et pathologiques reposent essentiellement sur des méthodes séparatives et cytochimiques. Cependant, l'identification de mutants nécessite parfois des techniques plus complexes mises en œuvre dans des laboratoires spécialisés, phénotypiques ou génotypiques avec comparaison des comportements dans des conditions expérimentales différentes.

# A. Prélèvement

L'étude des hémoglobinopathies nécessite un prélèvement de sang veineux réalisé sur anticoagulant (EDTA ou ACD). Le délai de conservation à + 4 °C ne doit pas dépasser une semaine. Les recherches d'hémoglobines instables doivent se réaliser sur sang frais.
Toutefois, un prélèvement de sang capillaire effectué au bout du doigt peut également convenir, notamment chez les nouveau-nés et les jeunes enfants. Par ailleurs, les tests de dépistage sont le plus souvent réalisés sur un prélèvement par piqûre au talon et recueil du sang sur un papier buvard, d'où il sera ensuite élué.

## 1. Préparation de l'hémolysat

Dans le cas d'un prélèvement veineux ou capillaire, le sang est centrifugé pour éliminer plasma et globules blancs afin de pouvoir étudier les hématies, qui sont préalablement lavées plusieurs fois par addition d'eau physiologique (NaCl 0,15 M).
L'hémolyse des hématies lavées est réalisée par addition d'eau distillée froide ou de cyanure de potassium en présence d'agents tensioactifs type saponine ou digitonine. L'hémolysat est centrifugé et les examens sont pratiqués sur le surnageant clair, débarrassé de stromas globulaires. Les hémolysats peuvent être gardés quelques semaines à – 20 °C ou quelques mois à – 80 °C. Pour une technique séparative par CHLP, l'hémolysat est préparé à partir de sang total.

## 2. Dosage de l'hémoglobine

Différentes techniques, toutes fondées sur l'utilisation des propriétés spectrales de l'hémoglobine, peuvent être utilisées. Le Comité international de standardisation en hématologie préconise la méthode de Drabkin. Cette technique permet la transformation de l'hémoglobine en cyanméthémoglobine par la solution de Drabkin comprenant du ferricyanure et du cyanure de potassium. La coloration rouge obtenue, très stable, est appréciée par spectrophotométrie à 540 nm. Le dosage de l'hémoglobine permet de standardiser la concentration de l'hémolysat pour les techniques séparatives.

# B. Méthodes biochimiques

Parmi les techniques séparatives de base utilisées dans un laboratoire d'exploration des hémoglobinopathies, la CHLP sur échangeur de cations ou l'électrophorèse à pH alcalin sont utilisées mais toujours associées à des techniques complémentaires judicieusement choisies. Quelles que soient les techniques, il faudra toujours des échantillons témoins.

## 1. Techniques de base

### a) Électrophorèse à pH alcalin

La séparation des hémoglobines par électrophorèse à pH alcalin (pH 8,5 à 9) constitue une technique standard pour l'étude des hémoglobinopathies. Le *tableau* propose de façon schématique la démarche phénotypique mise en œuvre au laboratoire.

### Méthode

Différents supports ont été proposés : papier, gel d'amidon, gel de polyacrylamide, mais actuellement acétate de cellulose et surtout agarose, supports disponibles dans le commerce. Sur ce dernier support, la migration dure par exemple 35 minutes à 120 V en tampon Tris-barbital. Après migration, la coloration spécifique des protéines par le noir est mise en œuvre. L'étude de la répartition des différentes fractions est possible par densitométrie, mais manque cependant de sensibilité pour des bandes de faible intensité.

### Interprétation

Chez l'adulte, l'HbA est majoritaire (97 ou 98 %), l'HbF non détectable et l'HbA2 comprise entre 2 et 3 %. Il est courant d'observer une ou deux bandes correspondant à l'anhydrase carbonique des hématies près du dépôt.

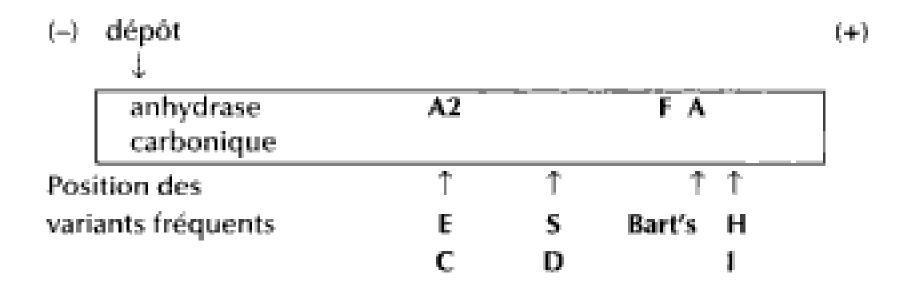



**Figure 2.** Ordre de la séparation de la cathode vers l'anode

Il est alors possible de mettre en évidence sur le tracé électrophorétique :

- des anomalies quantitatives du tracé, caractéristiques des syndromes thalassémiques ;
- et/ou des anomalies qualitatives du tracé, c'est-à-dire la présence d'hémoglobines anormales.

La séparation des hémoglobines anormales repose sur l'appréciation des différentes mobilités dues aux variations de charges électriques, dépendant des changements d'acides aminés. Par exemple, à pH 8,6, l'hémoglobine S (6glu → val) migre plus lentement que l'hémoglobine A, mais plus vite que l'hémoglobine C (6glu → lys).

### Limites de la technique

Un tracé normal ne signifie pas une absence d'hémoglobinopathie, d'où la nécessité d'intégrer pour le diagnostic, le tableau clinique et des techniques complémentaires. Elle présente en outre un faible pouvoir résolutif, certains variants ayant des mobilités proches.

## b) CLHP sur colonne échangeuse de cations

Cette technique (CE-HPLC) est actuellement de plus en plus utilisée grâce aux automates permettant l'étude de grandes séries d'échantillons. Il est ainsi possible de séparer les principales hémoglobines en 5 ou 6 minutes et de déterminer avec précision les pourcentages d'HbA2 et HbF. L'élution se fait par gradient de pH avec deux tampons phosphate (*fig.* 3, d'après www.Bio-Rad.com).

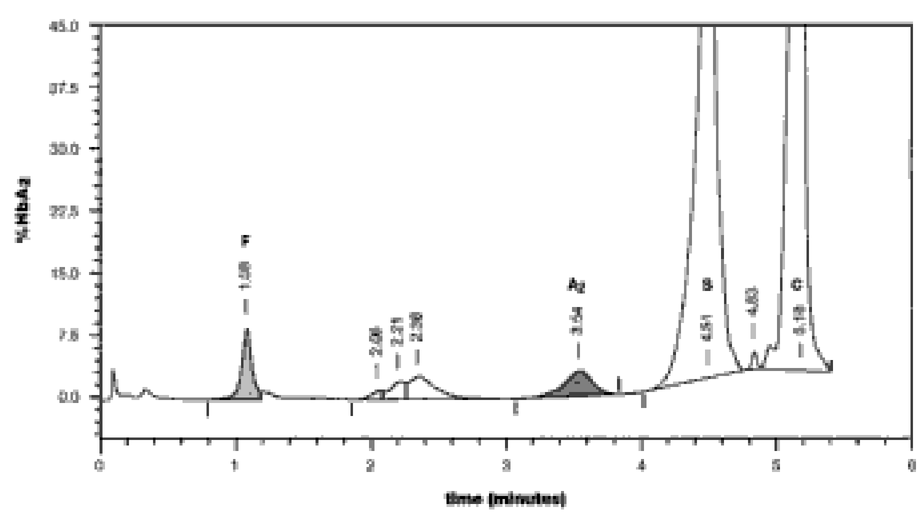



**Figure 3.** Chromatogramme

## 2. Autres techniques de séparation

### a) Électrophorèse en agarose à pH légèrement acide (pH 6 à 6,5)

À un pH légèrement acide, il est possible de différencier des hémoglobines migrant à des vitesses voisines lors de l'électrophorèse à pH alcalin. En tampon légèrement acide, la mobilité des hémoglobines dépend surtout de leur solubilité. Le support est coloré au noir amido. La méthode est sensible et permet l'étude des anomalies qualitatives de l'hémoglobine. La séparation des hémoglobines F et A est bonne (l'hémoglobine F migre alors plus vite que l'hémoglobine A). On peut de plus différencier :

- HbH et HbI ;
- HbA2 et HbE, HbC ;
- HbD et HbS.

### b) Isofocalisation sur gel d'agarose

Méthode de séparation dans un gradient de pH, elle permet l'étude des mutants d'hémoglobines par leurs différences de point isoélectrique. C'est une méthode très résolutive. Ainsi il est possible de séparer HbS et D ou HbC et E, mais aussi HbF et A. Elle est fort intéressante pour le diagnostic néonatal de la drépanocytose (repérage facile de HbS). En effet, la présence d'HbF en grande quantité chez le nouveau-né modifie la sensibilité de l'électrophorèse à pH alcalin.

## 3. Techniques complémentaires

Elles permettent de confirmer une anomalie et d'affirmer le diagnostic, en précisant l'importance des anomalies.

### a) Dosage de l'hémoglobine A2

Les techniques chromatographiques par échange de cations permettent, outre la quantification de la fraction A2, celle des autres fractions séparées, notamment F et les hémoglobines anormales, mais nécessitent une bonne maîtrise des paramètres de séparation. Le taux usuel est inférieur à 3 % du taux d'hémoglobine totale. Des valeurs supérieures à 3,5 % sont considérées comme pathologiques et évoquent des β-thalassémies hétérozygotes. Des diminutions du taux d'HbA2 évoquent des α-thalassémies (au moins deux gènes atteints) et des αδ-thalassémies.

# Physiologie des lignées granulocytaires

M.-R. BOISSEAU, P. BERNARD†
Laboratoire d'hématologie, Université Bordeaux-II.
D. BORGEL, UFR des sciences pharmaceutiques, Paris XI.
(révision 2007).

*On distingue trois lignées granulocytaires : neutrophile, éosinophile et basophile, aisément identifiables par leurs granulations cytoplasmiques, et présentant des physiologies différentes. Le polynucléaire neutrophile (PN) joue un rôle majeur dans les processus de défense de l'organisme contre les agents infectieux. Sa production, sa morphologie et ses fonctions composeront la partie principale de ce chapitre. Les aspects particuliers des éosinophiles et des basophiles seront évoqués en fin de chapitre.*

# I. Schéma général de l'hématopoïèse

La fonction principale du système hématopoïétique est le renouvellement adapté et continu des cellules du sang, tout au long de la vie, à partir des cellules souches (CS). En effet, mis à part certains lymphocytes, les cellules circulantes ont une durée de vie limitée et ne peuvent pas se renouveler. Dans le schéma général de l'hématopoïèse, les CS constituent un premier compartiment : ces cellules ont à la fois la capacité de s'autorenouveler et de donner naissance à l'une ou l'autre des différentes lignées myéloïdes (c'est-à-dire granulocytaire, érythroblastique et mégacaryocytaire) : les cellules souches sont multipotentes. Elles sont très peu nombreuses dans la moelle et sont le plus souvent quiescentes. Leur exploration directe est quasiment impossible chez l'homme. Par des mécanismes complexes où interviennent l'environnement cellulaire et diverses cytokines (molécules régulatrices), les CS peuvent être stimulées et produire des progéniteurs (CFU, *colony-forming unit*). Les CFU constituent le deuxième compartiment de l'hématopoïèse. Il s'agit de cellules programmées, engagées dans l'une ou l'autre des lignées, capables d'une importante prolifération, mais ayant perdu la propriété d'autorenouvellement. Il est possible d'étudier les CFU *in vitro* (formation de colonies dans des systèmes de culture en milieu semi-solide, en présence de cytokines). Ces cellules sont peu nombreuses au sein du tissu médullaire. La prolifération exponentielle des CFU fait qu'une altération minime de leur cinétique peut avoir des conséquences importantes en fin de lignée. C'est au niveau des CFU qu'agissent les principales cytokines régulatrices de l'hématopoïèse. Le troisième compartiment de l'hématopoïèse est celui des lignées cellulaires morphologiquement identifiables ou progéniteurs. Elles représentent l'essentiel des cellules de la moelle observables au microscope (myélogramme). Dans ce compartiment, les dernières étapes de la prolifération sont contemporaines de la différenciation cellulaire, c'est-à-dire, pour chaque lignée, l'acquisition des fonctions spécialisées et des caractères morphologiques correspondants.

# II. Lignée granulocytaire neutrophile

## A. Physiologie : origine et régulation

Le progéniteur de la lignée granulocytaire neutrophile est appelé « CFU-GM » (*colony-forming unit – granulomonocytic*) car, selon les facteurs de stimulation

auxquels elle répond, cette cellule peut donner naissance à la lignée granulocytaire neutrophile ou à la lignée monocytaire, ou aux deux lignées dans la même colonie. Il est intéressant de souligner la relation entre ces deux lignées, alors que les précurseurs des lignées granulocytaires éosinophile et basophile sont différents. Les CFU-GM ne sont pas identifiables morphologiquement mais par culture en milieu semi-solide (agar ou méthylcellulose), en présence de facteur stimulant. Dans la moelle normale, on trouve de 1 à 10 CFU-GM pour mille cellules. Ces cellules peuvent passer dans le sang (comme les cellules souches et les autres progéniteurs). Les principaux facteurs stimulants, appelés « CSF » (*colony-stimulating factor*) sont connus et peuvent être obtenus à l'état pur par génie génétique. Il s'agit des glycoprotéines, produites par diverses cellules du sang (lymphocytes, monocytes) ainsi que par les cellules endothéliales, les fibroblastes et les macrophages. Les CSF sont nombreux, agissent en cascade, et ont des effets multiples. Pour la lignée granulocytaire neutrophile, les trois principaux sont le GM-CSF (granulocyte monocyte-CSF), l'IL-3 (interleukine 3) et le G-CSF (granulocyte-CSF). Leur action est partiellement synergique, le GM-CSF et l'IL-3 agissant sur les cellules les plus précoces de la lignée, alors que le G-CSF stimule les stades les plus matures. Le GM-CSF et l'IL-3 agissent sur plusieurs lignées hématopoïétiques (spécificité large) alors que le G-CSF a une spécificité d'action restreinte à la lignée granulocytaire. Outre leur action sur la prolifération cellulaire, ces facteurs agissent aussi en activant les fonctions des polynucléaires matures. Depuis peu, certains d'entre eux sont utilisés en thérapeutique, pour stimuler la lignée granulocytaire (neutropénies ou agranulocytoses, notamment induites par les chimiothérapies anticancéreuses).

## B. Morphologie et structure

Les cellules de la lignée granulocytaire neutrophile représentent les deux tiers des cellules de la moelle normale chez l'adulte (myélogramme, obtenu par ponction-aspiration au niveau du sternum : un frottis cellulaire est étalé sur lame, coloré au May-Grunwald Giemsa, puis observé au microscope). Le myéloblaste, le promyélocyte et le myélocyte se divisent. Le métamyélocyte n'est plus capable d'entrer dans un cycle cellulaire et se transforme en polynucléaire mature. Le temps de passage du myéloblaste au polynucléaire est de trois à cinq jours. Une réserve de polynucléaires est stockée dans la moelle avant de passer dans la circulation.

### 1. Myéloblaste

Il représente environ 1 % des cellules du myélogramme. C'est une cellule de 20 à 25 µm, de forme ronde ou ovale, au cytoplasme peu abondant (rapport de surface noyau-cytoplasme élevé). Le noyau est gros, rond, central, sa chromatine est fine et un ou plusieurs nucléoles sont visibles. Le cytoplasme est clair, de teinte bleue (basophile). Tous ces caractères morphologiques sont en fait ceux des cellules peu différenciées. Dans le cytoplasme, l'existence de granulations rouges (azurophiles), dites « primaires » car les premières à apparaître, permet d'identifier cette cellule peu différenciée et d'indiquer son appartenance à la lignée granulocytaire.

## 5. Granulocytes ou polynucléaires neutrophiles

Ils représentent 15 à 30 % des cellules de la moelle (dans laquelle ils sont non seulement produits mais aussi stockés pendant plusieurs jours). Ce sont des cellules arrondies de 15 à 20 µm. Leur noyau est segmenté en plusieurs lobes, réunis par un filament de chromatine. Le nombre de lobes augmente avec l'ancienneté de la cellule mais ne dépasse normalement pas cinq (formule d'Arneth : 50 % de granulocytes à trois lobes, 3 % à cinq lobes). La chromatine est très dense, répartie en mottes. Le cytoplasme est de teinte beige clair, rempli de granulations spécifiques. On trouve aussi quelques granulations azurophiles.
Au microscope électronique, le noyau apparaît formé de blocs d'hétérochromatine très dense. Le cytoplasme contient de rares ribosomes, un appareil de Golgi rudimentaire. La cellule n'est donc plus capable de renouveler son stock de granulations. La maturation cellulaire est achevée.

## C. Fonctions du polynucléaire neutrophile

Les granulocytes sont pleinement fonctionnels au moment de leur passage dans la circulation. Ils sont capables de migration orientée (chimiotactisme) à travers la paroi des vaisseaux en direction des foyers infectieux, de phagocytose et de bactéricidie.
Dans la mise en jeu spécifique de ces fonctions entrent d'abord des glycoprotéines de membrane, dites « molécules d'adhésion » ou « intégrines » (Mac-1, LFA-1, p150,95), responsables de l'adhésion à l'endothélium vasculaire, de la diapédèse à travers cet endothélium et, enfin, des contacts entre le granulocyte et sa cible. Plusieurs substances présentes dans les foyers inflammatoires ont pour effet d'augmenter le nombre des molécules d'adhésion à la surface du granulocyte : ces substances sont des « chimioattractants » (par exemple, leucotriène B4 ou fraction C5a du complément). Après liaison membranaire avec un chimioattractant, la transduction du signal (activation de la protéine G, liaison de la guanosine triphosphate ou GTP, activation de la phospholipase C, production d'inositol triphosphate et de diacylglycerol) aboutit à une augmentation de la concentration cytoplasmique en $Ca^{++}$, et en protéine kinase C. Il en résulte une modification du cytosquelette, responsable des mouvements actifs et de l'augmentation de la surface membranaire.
Après sa migration à travers l'endothélium, le polynucléaire entre en contact avec sa cible opsonisée (sur laquelle des anticorps et la fraction C3b du complément sont fixés) par ses récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines et pour la fraction C3b. Si la particule est de petite taille, elle est englobée par la membrane avec formation d'une vacuole de phagocytose. Le contenu des granules est libéré dans cette vacuole (phagolysosome), et la bactéricidie commence. Il y a aussi libération extracellulaire du contenu des granules, responsable de lésions tissulaires.
La principale réaction de bactéricidie implique une forte et brutale consommation d'oxygène et met en jeu deux enzymes clés : la NADPH oxydase et la myéloperoxydase. La voie du shunt des hexoses monophosphates produit le NADPH, qui est oxydé par la NADPH-oxydase. Cette réaction provoque la réduction de l'oxygène en anion superoxyde et en radical libre •OH. En présence de superoxyde dismutase (SOD), l'oxygène est transformé en eau oxygénée $H_2O_2$. La myéloperoxydase interagit avec l'$H_2O_2$ et un ion $Cl^-$ pour former l'acide hypochlorique HOCl. L'anion superoxyde, les radicaux libres, l'acide hypochlorique sont fortement bactéricides.

D'autres systèmes bactéricides sont indépendants de l'oxygène. La baisse du pH local est par elle-même bactéricide ou bactériostatique. Le lysozyme (muramidase) attaque l'acide muramique de la membrane des bactéries. Les granules contiennent des molécules directement bactéricides (défensines, *bactericidal/permeability-increasing protein* ou BPI).

# III. Polynucléaire éosinophile

## A. Physiologie : origine et régulation

Deux attributs fonctionnels particuliers à éosinophile distinguent le polynucléaire éosinophile du neutrophile : son aptitude à inactiver les médiateurs libérés au cours des réactions d'hypersensibilité immédiate (allergie) et son aptitude à altérer les stades larvaires de certains parasites.
Le progéniteur de l'éosinophile (CFU-Eo) est distinct du CFU-GM. Il répond au GM-CSF, mais il est spécifiquement stimulé par l'IL-5. La production des éosinophiles est médullaire. Le passage dans le sang est très bref, puis les éosinophiles migrent dans certains tissus, principalement sous les surfaces épithéliales exposées à l'environnement externe (peau, poumons, tube digestif, bas appareil urinaire, utérus). Ils sont éliminés dans l'intestin et les bronches.

## B. Morphologie et structure

Morphologiquement, le polynucléaire éosinophile doit son nom à l'affinité de ses granulations spécifiques pour les colorants acides comme l'éosine. Sur frottis, c'est une cellule de 12 à 17 µm, au noyau le plus souvent bilobé, au cytoplasme rempli de granulations volumineuses, arrondies, régulières, de couleur jaune orangé.
En ultrastructure, la présence d'un nucléole, de ribosomes libres et d'ergastoplasme, ainsi que de nombreuses mitochondries montrent que l'éosinophile est une cellule métaboliquement active et capable de synthèses protéiques. Le Golgi est développé. Les granulations spécifiques sont de plusieurs types :

- granulations de petite taille ;
- grosses granulations, plus nombreuses, entourées d'une double membrane et comprenant deux parties : une structure centrale pseudo-cristalline, rectangulaire ou losangique et présentant une striation plus ou moins nette, et une matrice périphérique amorphe.

Les cristaux de Charcot-Leyden sont différents : ils sont trouvés dans les infiltrations tissulaires massives par les éosinophiles et proviennent de la désintégration de ces derniers. On peut les rencontrer dans l'expectoration de sujets atteints d'asthme allergique ou dans les selles des sujets atteints de maladies parasitaires.
Parmi les constituants chimiques des granulations éosinophiles, la protéine basique majeure est en quantité abondante. Ses propriétés et son rôle sont mal connus, elle n'est pas antihistaminique et elle est capable de neutraliser l'héparine. Les autres constituants sont des enzymes hydrolytiques (lysosome) parmi lesquelles l'histaminase, l'arylsulfatase, le plasminogène. Il n'y a pas de lysozyme. La peroxydase éosinophile est différente de celle de la lignée neutrophile.

### C. Fonctions

Par rapport aux neutrophiles, les éosinophiles ont une moindre capacité de phagocytose et de bactéricidie. Les facteurs chimiotactiques particuliers à l'éosinophile sont l'histamine, l'ECF-A (*eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis*), la SRS-A (*slow reacting substance of anaphylaxis*), les HETE et la prostaglandine D2, tous ces facteurs étant libérés par les basophiles et les mastocytes au cours de la réaction d'hypersensibilité immédiate.
Cette réaction est déclenchée par la fixation d'immunoglobulines E sur un antigène responsable (allergène). Le couple antigène-immunoglobuline E se fixe spécifiquement sur la membrane d'un polynucléaire basophile ou d'un mastocyte, provoquant la dégranulation de ces cellules. Les substances libérées déclenchent la réaction d'hypersensibilité immédiate.
La principale fonction des éosinophiles est leur capacité de limiter cette réaction. L'histaminase et les prostaglandines de l'éosinophile détruisent l'histamine et donc limitent le phénomène inflammatoire. De plus, grâce à l'action fibrinolytique du plasminogène, l'éosinophile activerait la cicatrisation du foyer inflammatoire.
Dans la défense de l'organisme contre les parasites, l'éosinophile est cytotoxique : le phénomène est anticorps dépendant, c'est-à-dire qu'il n'a lieu que si le parasite cible est opsonisé par des anticorps spécifiques et la fraction C3 du complément. C'est la protéine basique majeure qui joue le rôle le plus important dans la destruction du parasite.

## IV. Polynucléaire basophile

### A. Morphologie et structure

Les basophiles jouent leur rôle principal lors de l'hypersensibilité immédiate, comme les mastocytes dont ils sont très proches. Les granulations cytoplasmiques sont foncées, rouge-violet. Elles contiennent l'histamine et les substances chimiotactiques auxquelles l'éosinophile est sensible. L'activité peroxydasique est différente de celle des éosinophiles et des neutrophiles.

### B. Fonctions

Les fonctions de phagocytose et bactéricidie sont peu développées. La principale fonction est la dégranulation (voir « *Fonction du polynucléaire éosinophile* »). Après celle-ci, le polynucléaire basophile est capable d'une nouvelle synthèse de granules spécifiques.

***Pour en savoir plus***


- Zittoun R., Samama M., Marie J.-P. *Manuel d'hématologie*. Doin.
- Theml H. *Atlas de poche d'hématologie*. Paris, Flammarion Médecine-Sciences.

# Physiologie de la lignée lymphocytaire

M.-R. BOISSEAU, P. BERNARD†
Laboratoire d'hématologie, Université Bordeaux-II.
D. BORGEL, UFR des sciences pharmaceutiques, Paris XI
(révision 2007).

*Les lymphocytes B (pour bone marrow ou bursa, lieux de leur production chez les mammifères ou les oiseaux) sont les cellules de l'immunité humorale. Les lymphocytes T (thymus) jouent leur rôle principal dans l'immunité cellulaire et assurent la régulation de l'immunité humorale. Les lymphocytes B ou T sont capables de reconnaître spécifiquement un antigène (une molécule étrangère à l'organisme) au moyen d'un récepteur membranaire : anticorps ou immunoglobuline (Ig) pour les lymphocytes B, récepteur pour l'antigène ou TCR (T cell receptor, récepteur de cellules T) pour les lymphocytes T. Le récepteur est constitué d'une région variable qui reconnaît l'antigène (spécificité idiotypique) et d'une région constante. Les gènes codant pour ces récepteurs B et T sont différents, mais leurs structures sont semblables et ils sont réarrangés et activés selon les mêmes processus moléculaires.*

# I. Lymphocytes B

## A. Ontogenèse

L'ontogenèse des cellules lymphoïdes B est l'ensemble des étapes qui depuis la cellule souche conduisent à l'apparition de cellules capables de synthétiser des immunoglobulines (Ig). Les premières étapes de prolifération et différenciation (cellules pré-B, lymphocytes B immatures) ont lieu dans la moelle osseuse et sont indépendantes de toute stimulation antigénique. Les lymphocytes B matures, qui ne prolifèrent plus, passent dans le sang puis se localisent dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions, plaques de Peyer du tube digestif, amygdales). Là, à condition de recevoir une stimulation antigénique, ils seront activés, passeront par une nouvelle phase de prolifération, et se transformeront en plasmocytes sécrétant de grandes quantités d'immunoglobulines ou en cellules « mémoire ».

### 1. Phase initiale, antigène-indépendante, acquisition de la spécificité idiotypique

Cette phase est caractérisée par une succession ordonnée de réarrangements des gènes codant pour les immunoglobulines et par une prolifération polyclonale. Les cellules pré-B ne portent pas d'anticorps de surface : les antigènes n'interviennent donc pas dans leur production. Ce sont de grandes cellules, en multiplication active. Le gène codant pour les chaînes lourdes des immunoglobulines est localisé sur le chromosome 14 chez l'homme (*fig. 1*). Il est constitué d'une succession d'exons : de 5' en 3' on trouve les exons V (variable, au nombre d'environ 500 codant pour la partie NH2 terminale de l'immunoglobuline) puis les exons D (diversité, environ 20), les exons J (jonction, six segments). Ces exons vont coder pour la partie variable des chaînes lourdes d'immunoglobuline. Plus en 3' se situent les exons C codant pour la partie constante. Le gène ne peut être transcrit qu'après réarrangement. La première étape est la mise en contact de l'un quelconque des segments D avec l'un des segments J. L'ADN intermédiaire est délété. Ce réarrangement DJ se produit sur les deux chromosomes 14. Ensuite, sur un des deux chromosomes, un quelconque des segments V est mis au contact de DJ, avec

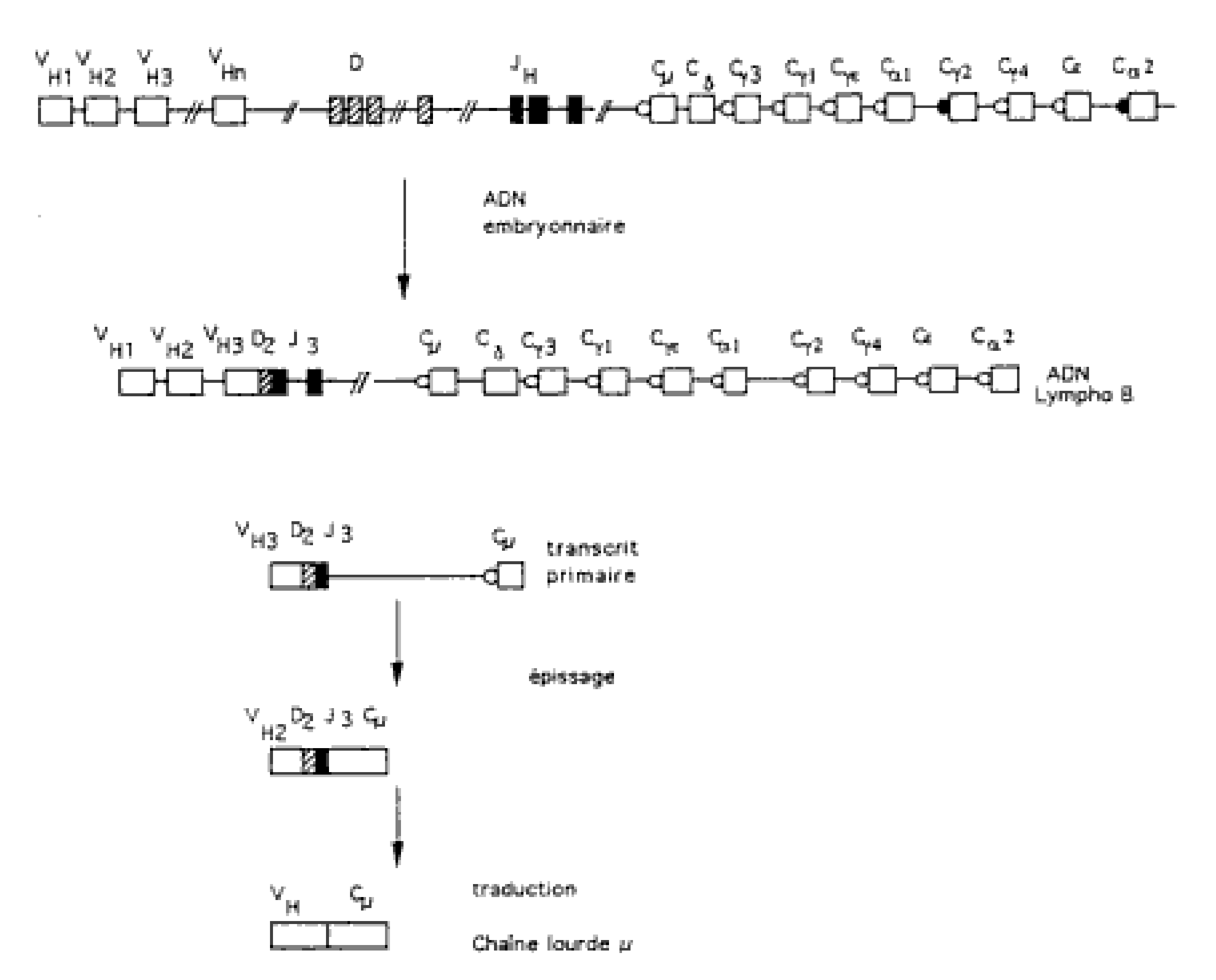



**Figure 1.** Schéma de l'organisation du gène des chaînes lourdes (chromosomes 14)

encore perte de l'ADN intermédiaire. Si la recombinaison VDJ est fonctionnelle (cadre de lecture ouvert, transcription possible), la production de chaînes lourdes commence. Si la recombinaison est incorrecte, « non productive », c'est le gène du deuxième chromosome 14 qui est réarrangé. Ainsi, une cellule pré-B ne peut produire deux chaînes lourdes ayant des spécificités différentes.

Le très grand nombre des réarrangements possibles entre les segments V, D et J est à l'origine de la singularité de chaque cellule pré-B, et de la spécificité de l'immunoglobuline synthétisée.

De plus, lors de la recombinaison VDJ, des petites délétions sont possibles, ou bien quelques nucléotides sont incorporés à l'ADN, augmentant encore la singularité du gène réarrangé et la spécificité de la chaîne lourde produite.

L'étape suivante est le réarrangement des gènes des chaînes légères d'immunoglobuline. Les gènes codant pour les chaînes k et l sont localisés respectivement sur les chromosomes 2 et 22. La structure de ces gènes est proche de celle du gène des chaînes lourdes, et le mécanisme des recombinaisons V-J est le même. Il y a d'abord réarrangement d'un gène de chaîne k. Si celui-ci est productif, la transcription de la chaîne légère commence et une IgM entière est assemblée par la cellule B. Cette IgM est caractérisée par son déterminant idiotypique (constitué par les parties variables de la chaîne lourde et de la chaîne légère k) : celui-ci est fixé pour le clone qui pourra naître de cette cellule. En effet, tout autre réarrangement des gènes d'immunoglobulines est alors bloqué (exclusion allélique).

Si le réarrangement est non productif, c'est d'abord le deuxième gène des chaînes k qui est réarrangé. Dans un tiers des cas, ce second réarrangement est encore non productif. C'est alors un gène codant pour une chaîne légère l qui est réarrangé.
Il y a donc une succession ordonnée des réarrangements des gènes des immunoglobulines. Les complexes enzymatiques entrant en jeu sont connus (nucléase 1, recombinases, terminale déoxynucléotidyl transférase ou TdT) mais l'accessibilité des différents segments d'ADN à ces enzymes suit une programmation encore mal connue. La transcription des gènes réarrangés est régulée par le rapprochement de séquences promotrices et activatrices, et par l'action sur l'ADN de protéines nucléaires spécifiques.
Les chaînes lourdes µ et les chaînes légères sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique. L'IgM complète migre vers la membrane cellulaire *via* l'appareil de Golgi : la présence d'IgM de surface caractérise le lymphocyte B immature. Cette cellule ne prolifère plus.
La moelle osseuse produit continuellement des lymphocytes B avant tous des spécificités anticorps différentes (spécificité idiotypique). Ces cellules migrent vers les organes lymphoïdes secondaires. La migration est dirigée par les intégrines (LFA-1, CR3, p150,95). Les lymphocytes matures modifient l'isotype de leur immunoglobuline, c'est-à-dire la partie constante de la chaîne lourde, sans modification de la partie variable (le déterminant idiotypique). Une première modification survient sans réarrangement génique, et avant tout contact antigénique : c'est la production d'IgD en même temps que l'IgM, liée à un changement de structure de l'ARN messager (épissage alternatif). Le lymphocyte mature porte donc deux types d'immunoglobulines de surface : IgM et IgD.

## 2. Phase secondaire : activation et commutation isotypique

Dans les organes lymphoïdes, les lymphocytes B matures entrent en contact avec leur antigène spécifique par la partie variable de leur IgM de surface. Ce contact (facilité par les lymphocytes T) provoque une activation cellulaire avec entrée dans le cycle cellulaire, prolifération clonale (rôle stimulant des interleukines IL-1 et IL-2), commutation isotypique et apparition de nouveaux récepteurs de surface.
La commutation isotypique est un réarrangement du gène de la chaîne lourde. Des séquences de commutations S (*switch*) sont localisées entre les différents segments de la région C du gène. L'ADN est coupé au niveau de la première séquence S et de l'une des suivantes, aboutissant à des délétions de segments de la région C, et donc à la production d'IgG (1, 2, 3 ou 4), A (1 ou 2), D, E ou M. Ainsi, dans un clone de cellules B présentant toutes la même spécificité idiotypique, apparaissent différentes Ig ayant différentes fonctions selon leur isotype : des IgM sont produites précocement lors de la réponse immune, alors que lors d'une réponse secondaire, ce sont des IgG qui sont produites. Les liaisons cellulaires particulières sont le mastocyte pour l'IgE (allergie), les polynucléaires et les monocytes-macrophages pour les IgG. Les IgA sont sériques ou sécrétées (lait).
L'antigène est internalisé dans le cytoplasme, modifié, puis à nouveau présenté à la surface de la cellule, en association avec les molécules du système majeur d'histocomptabilité (classe II). Donc, comme les monocytes-macrophages, les lymphocytes B jouent un rôle de présentation de l'antigène aux lymphocytes T : cette

# II. Lymphocytes T

## A. Ontogenèse

La maturation des cellules T a lieu dans le thymus (région corticale puis médullaire). La première étape est le réarrangement des gènes du TCR. Celui-ci est un hétérodimère constitué des chaînes alpha-bêta ou delta-gamma, ayant la même structure variable, site de reconnaissance de l'antigène, et une région constante, transmembranaire, couplée à une autre molécule membranaire CD3. Les gènes codant pour ces différentes chaînes comportent des segments V, D, J (ou V, J) et un ou deux segments C. Comme pour les gènes des immunoglobulines, il existe un programme des réarrangements des gènes du TCR : dans l'ordre, chaînes gamma, delta, bêta puis alpha. Ces réarrangements sont très précoces, dès le stade du prothymocyte. Les thymocytes acquièrent ensuite l'ensemble du TCR, c'est-à-dire la liaison au niveau de la membrane entre l'hétérodimère et la molécule CD3. Il semble que le TCR gamma-delta apparaisse plus précocement que le TCR alpha-bêta.

## B. Immunophénotype *(fig. 3)*

Dans la corticale du thymus, les précurseurs des lymphocytes T (pro- et préthymocytes) sont CD3 négatifs (–), CD4– et CD8–. Le prothymocyte est CD7+, le préthymocyte est CD7–, CD5– et CD2+. Le complexe membranaire TCR-CD3 apparaît avant les molécules CD4– et CD8–. Les thymocytes communs sont CD3+, CD4– et CD8–. Les thymocytes matures, trouvés dans la médullaire du thymus, sont devenus des cellules immunocompétentes et sont soit CD4–, soit CD8–. La quasi-totalité des lymphocytes T circulants portent le TCR alpha-bêta, lié à une molécule CD3, et expriment soit CD4, soit CD8. Une petite population porte le TCR delta-gamma, lié à une molécule CD3 et n'exprime le plus souvent ni CD4 ni CD8.
*À noter* : la molécule CD4 est un récepteur pour le virus VIH.

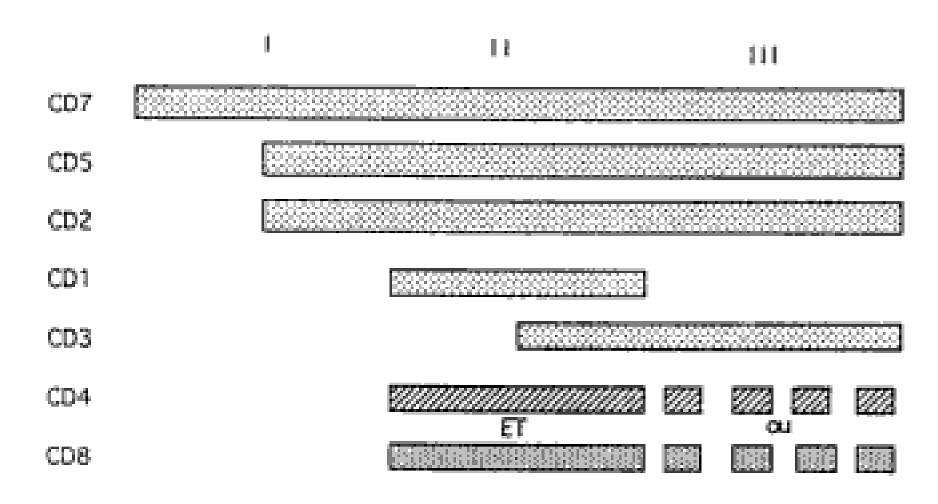



**Figure 3.** Immunophénotypes de la différenciation lymphoïde T

Le lymphoblaste présente les caractères morphologiques d'une cellule « jeune », peu différenciée, en cycle cellulaire : diamètre 15 à 20 mm, forme arrondie, cytoplasme très peu abondant, basophile, gros noyau ayant une chromatine fine, un ou deux nucléoles visibles.
Les petits lymphocytes mesurent 7 ou 8 mm. Il s'agit de cellules rondes dont le cytoplasme est très peu abondant, basophile clair, sans granulation. Le noyau est rond ou réniforme, sa chromatine est très dense, en grosses mottes, sans nucléole visible.
Les grands lymphocytes (10 à 15 mm) ont un cytoplasme plus étendu, peu coloré, pouvant contenir un petit nombre de granulations azurophiles (lysosome).
En microscopie électronique, la grande majorité des lymphocytes présentent les caractères nucléaires et cytoplasmiques des cellules au repos (quiescence) : le noyau est constitué de blocs denses d'hétérochromatine, le cytoplasme contient quelques ribosomes libres, l'appareil de Golgi est peu développé, les mitochondries sont peu nombreuses.
Le lymphocyte activé ou immunoblaste (transformé *in vitro* en présence de phytohémagglutinine) présente à nouveau les caractères morphologiques d'une cellule peu différenciée : c'est une grosse cellule (20 mm) au cytoplasme basophile, dont le noyau est clair et présente un gros nucléole central.
Le plasmocyte est le dernier stade de la maturation des lymphocytes B. C'est une grande cellule (20 à 30 mm), dont le noyau est excentré (chromatine très dense, en gros blocs irréguliers) et dont le cytoplasme est très basophile, sauf dans une zone claire (archoplasme) correspondant au Golgi. On trouve souvent des vacuoles volumineuses.

## L'essentiel de la question

La différenciation des lignées lymphoïdes n'est pas dissociable de l'ensemble du système immunitaire et de sa mise en action : il est donc utile de connaître aussi la physiologie des monocytes-macrophages, les aspects biochimiques et fonctionnels des immunoglobulines, du système du complément (complexe enzymatique de la lyse cellulaire), du système HLA, etc. qui participent tous aux défenses immunitaires.

# Physiologie des monocytes-macrophages

M.-R. BOISSEAU, P. BERNARD†
Laboratoire d'Hématologie, Université Bordeaux II.
D. BORGEL, UFR des sciences pharmaceutiques, Paris XI
(révision 2007).

*Les monocytes-macrophages constituent le système des phagocytes mononucléés (autrefois système réticulo-endothélial). Les monocytes, produits dans la moelle osseuse, circulent dans le sang, puis migrent vers les tissus où ils deviennent des macrophages. Leur morphologie et leurs fonctions sont diverses, selon les tissus ou organes où ils sont localisés. Principalement, ils sont à l'origine de la réponse immunitaire et de la réaction inflammatoire. Dans certaines lésions inflammatoires, ils peuvent évoluer en cellules géantes (tuberculose, par exemple).*

# I. Origine des monocytes : les CFU-GM, régulation de la production

Le progéniteur qui donne naissance à la lignée monocytaire est une cellule appelée CFU-GM (*colony forming unit – granulocytic/monocytic*). *In vitro*, dans un système de culture en milieu semi-solide, cette cellule produit une colonie de cellules appartenant à la lignée granulocytaire neutrophile, à la lignée monocytaire ou aux deux mélangées, selon les facteurs de croissance ajoutés à la culture. Parmi ces facteurs, le M-CSF (*monocytic colony-stimulating factor*) a une spécificité d'action restreinte à la lignée monocytaire. Il stimule la prolifération de la lignée monocytaire, augmente la durée de vie des monocytes et les fonctions des monocytes et des macrophages matures. Le gène humain du M-CSF est cloné. Il est localisé sur le bras long du chromosome 5. Les cellules productrices sont les fibroblastes et les monocytes eux-mêmes. Le récepteur membranaire spécifique (M-CSF-R) est retrouvé sur les monocytes, les macrophages et leurs précurseurs. Le gène humain du M-CSF-R est aussi localisé sur le bras long du chromosome 5 (autre nom de ce gène : C-FMS). Les monocytes matures assurent la régulation de la production en détruisant le M-CSF.

# II. Morphologie des monocytes

Sur un frottis sanguin, les monocytes sont des grandes cellules (diamètre : 15 à 25 µm). Leur noyau est irrégulier, la chromatine est finement dessinée. Leur cytoplasme, étendu, est gris ou bleu clair, pouvant contenir de très fines granulations. Les contours cellulaires sont irréguliers, avec des extensions de formes variées. Observés en suspension (contraste de phase), les monocytes vivants sont animés de mouvements amiboïdes, émettant des prolongements cytoplasmiques. Ils adhèrent au verre et s'y étalent (cette propriété d'adhérence au support est utilisée pour isoler les monocytes dans une suspension cellulaire). On identifie encore mieux ces cellules si on a provoqué *in vitro* la phagocytose de particules de latex, de levures ou de bactéries, visibles dans le cytoplasme.
Par réaction cytochimique sur frottis de moelle ou de sang, on peut révéler dans les monocytes et leurs précurseurs la présence de myéloperoxydase (identique à celle de la lignée granuleuse, mais plus faible), et des estérases, dont une est spécifique de la

lignée monocytaire (inhibée par le fluorure de sodium). Ces réactions peuvent aider à identifier les cellules peu différenciées dans une leucémie aiguë monoblastique.
On peut aussi détecter une activité phosphatase acide (par cytochimie) ainsi que le lysozyme (par immunocytologie), mais le lysozyme produit par les monocytes est peu abondant dans les cellules car immédiatement sécrété.
L'immunophénotypage est actuellement plus utilisé (fluorescence sur lame ou en cytométrie) : il permet d'identifier les monocytes par la détection des antigènes membranaires CD33, CD13 (communs aux lignées monocytaire et granuleuse), CD11b, CD14 ou CD16 (ce dernier identifie aussi les cellules NK). On détecte aussi la molécule CD4, récepteur pour le VIH.
En microscopie électronique, on visualise des mitochondries, un réticulum endoplasmique développé, un appareil de Golgi multipolaire et de nombreuses vacuoles ou lysosomes, apparaissant par bourgeonnement à partir de l'appareil de Golgi. Les vacuoles de lysosome contiennent les enzymes de la bactéricidie. On peut aussi trouver des vésicules de pinocytose.

## III. Fonctions des monocytes-macrophages : la réponse immunitaire

Dans l'organisation des défenses immunitaires, c'est-à-dire le rejet spécifique des corps reconnus comme étrangers, les monocytes-macrophages jouent un rôle essentiel, puisqu'ils sont à l'origine de la réponse immunitaire.
Ils sont localisés dans des territoires stratégiques (ganglions et rate, sang, séreuses), ce qui leur permet de s'infiltrer dans les tissus et d'entrer rapidement en contact avec un corps étranger (mobilité, chimiotactisme, adhésion). La captation du corps étranger est suivie de sa digestion incomplète (phagocytose, bactéricidie) et de sa transformation en fragments antigéniques qui sont extériorisés à la surface de la cellule (reconnaissance du non-soi) dans un complexe moléculaire (complexe majeur d'histocompatibilité, MHC classe II) et présentés aux lymphocytes T qui sont ainsi activés (coopération monocytes-lymphocytes).
Outre cette information spécifique des lymphocytes T, les monocytes-macrophages stimulés émettent des messages non spécifiques (Interleukine-1 – IL-1 –, *tumor necrosis factor* – TNFα –, prostaglandines E) responsables de la coordination de la réponse inflammatoire. L'activité des monocytes-macrophages est à son tour stimulée par le γ-interféron, produit par les lymphocytes T.

## IV. Phagocytose et bactéricidie

Ce sont les fonctions les mieux connues des monocytes. Elles sont essentielles dans les mécanismes de défense anti-infectieuse et les mécanismes d'épuration (par exemple, élimination des hématies vieillies). Le contact avec la particule à phagocyter est facilité par son opsonisation (son recouvrement par des anticorps,

si elle est antigénique, ou par la fraction C3 du complément). La membrane du monocyte porte des récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines et pour le complément. La particule est enveloppée par des mouvements cytoplasmiques. Une vacuole de phagocytose se forme, dans laquelle se déversent les lysosomes et leur contenu enzymatique.

La principale réaction de bactéricidie implique une forte et brutale consommation d'oxygène et met en jeu deux enzymes clés : la NADPH oxydase et la myéloperoxydase. La voie du shunt des hexoses monophosphates produit le NADPH, qui est oxydé par la NADPH oxydase. Cette réaction provoque la réduction de l'oxygène en anion superoxyde et en radical libre $^{\bullet}OH$. En présence de superoxyde dismutase (SOD), l'oxygène est transformé en peroxyde d'hydrogène $H_2O_2$. La myéloperoxydase interagit avec l'$H_2O_2$ et un ion $Cl^-$ pour former l'acide hypochlorique HClO. L'anion superoxyde, les radicaux libres, l'acide hypochlorique sont fortement bactéricides.

Ces composés bactéricides peuvent être libérés dans le milieu extracellulaire : fractions du complément, enzymes hydrolytiques comme la phosphatase acide, anion superoxyde, $H_2O_2$. Le lysozyme (muramidase) attaque l'acide muramique de la membrane des bactéries.

## V. Déclenchement de réaction inflammatoire : l'IL-1

Le monocyte-macrophage est la principale source cellulaire de l'IL-1. Il sécrète l'IL-1 dès son activation, soit *in vitro* (par une endotoxine bactérienne ou même par simple adhésion), soit *in vivo* (par le γ-interféron, sécrété par les lymphocytes T). Il y a en réalité deux gènes IL-1 (localisés sur le chromosome 2 chez l'homme) et deux produits (IL-1a et IL-1b) ayant sensiblement les mêmes activités biologiques.

L'IL-1 n'a pas d'effet direct, mais est responsable de la coordination de la réponse inflammatoire. C'est le premier signal dans une hiérarchie moléculaire complexe. De très nombreuses cellules ont des récepteurs pour l'IL-1 (en particulier les cellules du micro-environnement médullaire : lymphocytes T, cellules endothéliales, fibroblastes). Dans ces cellules (par un mécanisme moléculaire de stabilisation de certains ARN messagers), l'IL-1 augmente l'expression des gènes des facteurs de croissance (GM-CSF, G-CSF, IL-2, IL-6, etc.) et des molécules d'adhésion (ELAM-1, ICAM-1, etc.). À leur tour, ces facteurs activent les cellules effectrices de la réponse inflammatoire.

L'IL-1 a de très nombreux effets biologiques, tous étant des éléments de la réaction inflammatoire :

- cliniquement : hypotension artérielle, fièvre, augmentation de la perméabilité vasculaire, à l'extrême choc septique ;
- biologiquement : mise en circulation des polynucléaires neutrophiles, libération d'histamine par les basophiles et les mastocytes, dégranulation des éosinophiles, chimiotactisme des lymphocytes.

Les glucocorticoïdes inhibent la production d'IL-1.

## VI. Production de facteurs contrôlant l'hématopoïèse

Outre l'IL-1, les monocytes activés sécrètent plusieurs facteurs agissant sur l'hématopoïèse. Les principaux sont les *prostaglandines* E (inhibent les CFU-GM), les *interférons* α, β et γ, les *isoferritines acides* (inhibent l'ensemble des précurseurs hématopoïétiques), le *TNF*α (produit comme l'IL-1 sous l'effet du stimulus inflammatoire, agissant en synergie avec l'IL-1 dans la réaction inflammatoire, à la fois stimulant et inhibiteur indirect de l'hématopoïèse). Ces facteurs agissent directement ou indirectement, dans une coopération monocytes-lymphocytes T-cellules du stroma médullaire.

## VII. Autres fonctions des monocytes-macrophages

Ils synthétisent des protéases contribuant à la réaction inflammatoire : activateur du plasminogène, élastase, collagénase.
Après la réaction inflammatoire, les monocytes-macrophages contribuent aux phénomènes de cicatrisation : recrutement de fibroblastes et de cellules mésenchymateuses, synthèse de PDGF (*platelet-derived growth factor*, qui active les cellules musculaires lisses), de fibronectine (matrice extracellulaire), etc.
Ils ont un pouvoir tumoricide par les substances qu'ils sécrètent dans l'environnement des cellules malignes : les principales sont les protéines lysosomales, les métabolites de l'oxygène, les protéases, les fractions du complément, et aussi le TNFα.

***Pour en savoir plus***

- Dreyfus B. *L'Hématologie*, Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 1992.

# Physiologie de la lignée érythrocytaire

M.-R. BOISSEAU, P. BERNARD†
Laboratoire d'hématologie, Université Bordeaux-II.
D. BORGEL, UFR des sciences pharmaceutiques, Paris XI
(révision 2007).

*C'est la production de globules rouges capables d'assurer le transport de l'oxygène et du gaz carbonique. Le globule rouge ou hématie ayant une durée de vie moyenne de 120 jours, c'est 1/120e de la masse totale des hématies qui est renouvelée chaque jour, à l'état de base. Cette production permanente est de plus adaptée en fonction des besoins tissulaires en oxygène. Le principal acteur de cette adaptation est l'érythropoïétine.*

## I. Localisation de l'érythropoïèse au cours de la vie

Très tôt dans la vie embryonnaire, des îlots de cellules se différencient dans le tissu mésenchymateux extra-embryonnaire. Ces cellules donnent naissance à des érythroblastes synthétisant une hémoglobine embryonnaire (Gowers I et II puis Portland). Dès la sixième semaine, ces cellules migrent par voie sanguine vers le foie qu'elles colonisent. C'est l'érythropoïèse hépatique, qui dure pendant la plus grande partie de la vie fœtale. Dans le foie, les cellules hématopoïétiques donnent naissance à des érythroblastes qui synthétisent une hémoglobine fœtale (HbF : $\alpha 2\gamma 2$). Il existe aussi une érythropoïèse splénique moins importante. À partir du quatrième mois, la moelle osseuse se forme et devient capable d'héberger les cellules hématopoïétiques qui arrivent par voie sanguine. Cette localisation médullaire devient prépondérante vers le sixième mois.
Les cellules hématopoïétiques sont présentes dans la circulation sanguine pendant la vie embryonnaire et fœtale. À la naissance, le sang du cordon ombilical est encore riche en cellules hématopoïétiques. À la naissance, les cavités médullaires de tous les os sont entièrement remplies par les cellules hématopoïétiques. Ensuite, une transformation adipeuse de la moelle osseuse débute dans les os des extrémités. Chez l'adulte, les territoires hématopoïétiques sont localisés dans la moelle des os du tronc (vertèbres, sacrum, os, iliaques, côtes, sternum). Il est facile de prélever les cellules médullaires (pour examen cytologique ou pour greffe) au niveau des os superficiels comme le sternum ou les épines iliaques. Dans la moelle normale, les cellules de la lignée érythroblastique représentent environ 20 % des cellules hématopoïétiques. Elles synthétisent de l'hémoglobine A ($\alpha 2\beta 2$) pour 98 %, de l'hémoglobine A2 ($\alpha 2\delta 2$) pour 2 %, et des traces d'hémoglobine fœtale.
Au cours de certaines maladies (syndromes myéloprolifératifs), la rate récupère une fonction hématopoïétique. Chez l'adulte, les cellules hématopoïétiques sont localisées dans la moelle osseuse, mais un très petit nombre de ces cellules passe dans la circulation sanguine. Ce nombre peut augmenter en cas de stimulation de l'hématopoïèse (par exemple après une chimiothérapie).

## II. Les progéniteurs

L'érythropoïèse commence lorsqu'une cellule souche hématopoïétique (capable d'autorenouvellement et multipotente), se différencie sous l'effet de signaux incomplètement connus (intervention de l'environnement cellulaire et de cytokines régulatrices) et se transforme en progéniteur. Ce progéniteur prolifère et s'engage irréversiblement dans une voie de différenciation (granulo-monocytaire,

érythroblastique ou mégacaryocytaire). Les facteurs de croissance jouent un rôle essentiel : ainsi, les progéniteurs de l'érythropoïèse sont sensibles à l'action stimulante de l'érythropoïétine. Ils donnent naissance à la lignée érythroblastique. Cette lignée, morphologiquement identifiable, s'amplifie en même temps qu'elle se différencie (synthèse de l'hémoglobine). Les progéniteurs de l'érythropoïèse sont des cellules définies, non par leur aspect morphologique mais par leur capacité de prolifération en culture. Pour l'étude des précurseurs conditionnés, des cellules médullaires sont mises en culture dans un milieu semi-solide (méthylcellulose, agar), en présence de facteurs de croissance. Après plusieurs jours de culture, des colonies de cellules érythroblastiques apparaissent : elles peuvent être comptées et analysées en cytologie optique ou électronique, ou encore en immunocytologie.
Les progéniteurs érythroblastiques sont hétérogènes. Deux types de colonies sont observés :

- les *CFU-E* (*colony-forming unit erythroid*) sont des petites colonies compactes faites de quelques dizaines d'érythroblastes, poussant en cinq à huit jours (moelle humaine normale). L'obtention de ces colonies est très dépendante de la présence d'érythropoïétine dans le milieu de culture : il suffit de doses faibles pour stimuler les CFU-E ;
- les *BFU-E* (*burst-forming unit erythroid*) sont des conglomérats de plusieurs milliers d'érythroblastes répartis en gros amas. Ces colonies apparaissent en 10 à 18 jours chez l'homme. Elles ne sont sensibles qu'à de doses fortes d'érythropoïétine. D'autres facteurs de croissance sont aussi nécessaires : les plus importants sont l'interleukine-3 (IL-3) et le GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, facteur stimulant la croissance des lignées granuleuse et monocytaire).

Les BFU-E sont des progéniteurs, haut situés dans le schéma général de l'hématopoïèse : ils sont proches des cellules souches multipotentes et n'ont pas complètement perdu la capacité d'autorenouvellement. Ils sont capables de proliférer très activement. Les CFU-E, au contraire, sont des précurseurs tardifs, proches du proérythroblaste. Leur capacité de prolifération est relativement faible.
*NB* : les cellules souches qui sont à l'origine de l'appareil hématopoïétique ne peuvent pas être étudiées *in vitro*.

## III. Lignée érythroblastique : morphologie

Elle est bien connue car les cellules sont identifiables en cytologie courante (myélogramme). Ce sont les précurseurs de la lignée érythroblastique. On décrit quatre stades, marqués par quatre divisions cellulaires successives et par la différenciation du cytoplasme (changement de coloration dû à la charge progressive en hémoglobine) : le proérythroblaste, l'érythroblaste basophile I, l'érythroblaste basophile II, l'érythroblaste polychromatophile I, l'érythroblaste acidophile (ou polychromatophile II) qui expulse son noyau avant de se transformer en hématie. Le cycle cellulaire est rapide pour les deux premiers stades, plus lent ensuite. Au total, la lignée se développe en cinq jours environ chez un sujet sain et, à partir d'un proérythroblaste, aboutit théoriquement à la production de seize hématies. En réalité, des pertes de l'ordre de 10 %

## A. Érythropoïétine

C'est une protéine de 166 acides aminés ayant une masse moléculaire de 18 000 Da. Une forte glycosylation (indispensable pour l'activité biologique) double cette masse moléculaire. Il y a deux ponts disulfure. La molécule est très stable. Le gène humain de l'érythropoïétine est unique, composé de cinq exons, localisé sur le chromosome 7 (q21). Le clonage du gène a permis d'obtenir de l'érythropoïétine humaine recombinante en quantité industrielle permettant son emploi en thérapeutique (principale indication : l'anémie de l'insuffisance rénale chronique). L'érythropoïétine est synthétisée essentiellement par le rein hypoxique au niveau des cellules péritubulaires. Il existe aussi une synthèse hépatique minime. La durée de vie est de quelques heures dans le sang. Elle est éliminée par le rein après déglycosylation au niveau du foie.
L'érythropoïétine agit principalement au niveau de la CFU-E et des premiers stades de la lignée érythroblastique. Les précurseurs érythroblastiques et les érythroblastes portent un récepteur spécifique pour l'érythropoïétine. Elle accélère le cycle cellulaire, raccourcit la durée d'évolution de la lignée, stimule la synthèse d'hémoglobine. L'action au niveau des BFU-E est faible. Par ailleurs, il est à noter que l'érythropoïétine stimule la lignée mégacaryocyto-plaquettaire.
On peut aussi doser l'activité de l'érythropoïétine sur une culture de CFU-E. Récemment, la disponibilité d'érythropoïétine humaine recombinante a permis de préparer des anticorps mono- ou polyclonaux : des dosages immunologiques aisés et sensibles sont maintenant possibles (ELISA).
En pathologie, on connaît des polyglobulies dues à une hypersécrétion d'érythropoïétine, soit « appropriée » (par exemple dans l'insuffisance respiratoire, en raison d'une hypoxie tissulaire), soit « inappropriée » (par exemple, hypersécrétion d'érythropoïétine dans certains cancers du rein). En revanche, dans la polyglobulie primitive de Vaquez, c'est la lignée érythroblastique elle-même qui échappe à la régulation normale.

## B. Autres facteurs hormonaux

Agissant soit directement sur la lignée érythroblastique, soit par le biais de l'érythropoïétine, les hormones stimulant l'érythropoïèse sont les hormones thyroïdiennes, les hormones antéhypophysaires, les androgènes (ces derniers agissent sur l'hématopoïèse dans son ensemble). Les œstrogènes sont inhibiteurs.

## C. Facteurs exogènes

On peut enfin considérer comme facteurs de régulation les éléments exogènes indispensables à l'érythropoïèse : protéines, fer et cobalt, vitamine $B_{12}$ et acide folique, pyridoxine, acide ascorbique, riboflavine, acide pantothénique, acide nicotinique, vitamine E. Le fer, apporté par l'alimentation ou provenant de la dégradation des hématies vieillies (hémolyse), est indispensable pour la synthèse de l'hème. Le fer est transporté par la sidérophiline (ou transferrine) : c'est une glycoprotéine spécifique, qui se fixe électivement sur la membrane des érythroblastes. Les réserves mobilisables sont très peu abondantes et les anémies les plus fréquentes sont dues à des carences en fer.

# Physiologie de l'hémostase primaire et de la coagulation

P. GAUSSEM, M. AIACH, Service d'hématologie biologique,
Hôpital européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris.
Inserm U765, Faculté de pharmacie, Université René-Descartes, Paris.

**I. Hémostase primaire et sa régulation**

**A.** Adhésion des plaquettes
**B.** Changement de forme et activation plaquettaire
**C.** Agrégation des plaquettes et expression de surface procoagulante
**D.** Régulation de l'activation plaquettaire
**E.** Quelques notions des méthodes d'exploration de l'hémostase primaire

**II. Coagulation et sa régulation**

**A.** Facteurs de la coagulation
**B.** Génération de thrombine
**C.** Formation de fibrine
**D.** Régulation de la coagulation
**E.** Méthodes d'exploration de la coagulation

*L'hémostase est l'ensemble des phénomènes conduisant à l'arrêt d'une hémorragie.*

# I. Hémostase primaire et sa régulation

L'endothélium est une surface naturellement antithrombotique composée d'une monocouche de cellules endothéliales qui tapissent la lumière de tous les vaisseaux. Lors d'une brèche vasculaire, le sous-endothélium est exposé au courant circulatoire et les plaquettes adhèrent à cette surface thrombogène composée de collagène et de protéines adhésives comme la fibronectine, la thrombospondine, la laminine. Les propriétés des plaquettes sont médiées par un certain nombre de récepteurs de surface dont des récepteurs à sept domaines transmembranaires et des intégrines qui sont les glycoprotéines (GP) plaquettaires (*tab. 1*).

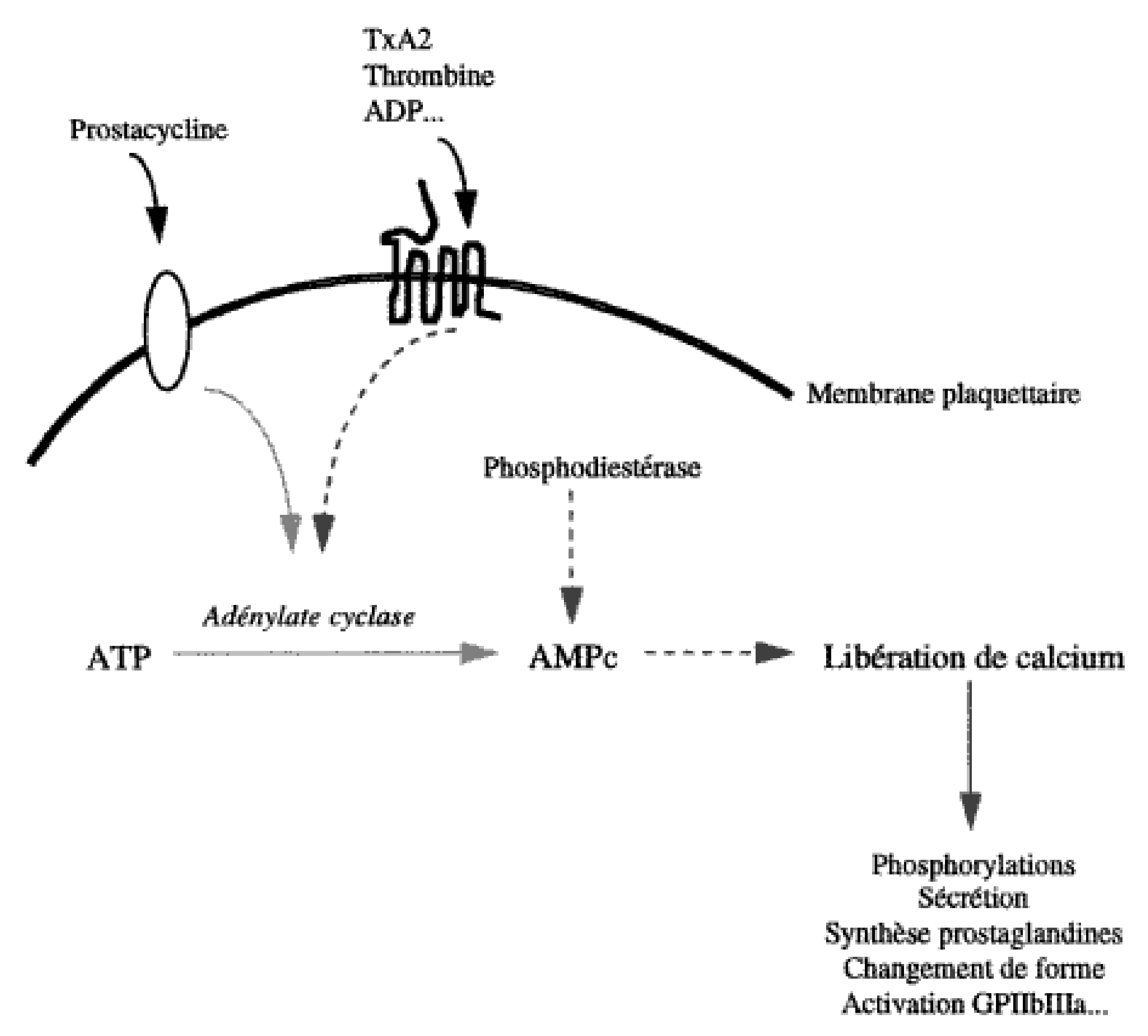
**Tableau 1.** Principaux récepteurs et glycoprotéines de la membrane plaquettaire

| Récepteur | Fonction | Ligand |
|---|---|---|
| GP Ib-V-IX | Adhésion | Facteur Willebrand (et thrombine) |
| GP IaIIa ($\alpha 2\beta 1$) | Adhésion | Collagène |
| GP IV | Adhésion | Thrombospondine |
| GP IIbIIIa ($\alpha IIb\beta 3$) | Agrégation | Fibrinogène (et facteur Willebrand) |
| PAR-1 | Activation | Thrombine |
| TP | Activation | TxA2 |
| P2Y1 et P2Y12 | Activation | ADP |
| Récepteur à la prostacycline | Inhibition de l'agrégation | Prostacycline (PGI2) |

PAR-1 : *protease activated receptor type 1*. TxA2 : thromboxane A2.

## A. Adhésion des plaquettes (*fig. 1*)

En présence de forces de cisaillement élevées (flux artériel), les plaquettes adhèrent à la brèche vasculaire grâce à l'interaction d'un complexe glycoprotéique (GP) de la membrane plaquettaire, la GP Ib-V-IX avec le facteur Willebrand ancré dans le sous-endothélium. Le facteur Willebrand circulant, en revanche, ne lie pas les plaquettes. La maladie de Bernard-Soulier est caractérisée par l'absence de GP Ib-V-IX. D'autres récepteurs plaquettaires interviennent pour fixer les plaquettes au collagène. Il s'agit notamment de la GP IaIIa (ou $\alpha 2\beta 1$) et de la GP VI. L'activation des plaquettes initiée par l'adhésion est renforcée par l'ADP libéré par les tissus lésés, le thromboxane A2 issu de l'hydrolyse de phospholipides membranaires et des premières traces de thrombine. Dans ces conditions, le complexe GP IIbIIIa (ou $\alpha IIb\beta 3$) est activé par changement de conformation et peut fixer de nouvelles molécules de facteur Willebrand.




AMPc, AMP cyclique – TxA2, thromboxane A2 – traits pleins, activation – traits hachurés, inhibition. Un taux élevé d'AMPc favorise la captation du $Ca^{2+}$ libre, donc inhibe l'agrégation des plaquettes.

**Figure 2.** Régulation de l'activation plaquettaire par l'AMP cyclique

L'influx de calcium permet la phosphorylation de la myosine et sa liaison à l'actine, phénomène responsable du changement de forme plaquettaire. Durant ces transformations, les granules restent dans la partie centrale de la plaquette grâce à un treillis serré de filaments d'actine. Seules les plaquettes en contact avec le substrat s'étalent, les plaquettes recrutées par la suite émettent des pseudopodes et libèrent une partie de leurs granules. L'enchevêtrement de leurs pseudopodes permet la formation du « clou plaquettaire ».
De façon concomitante au changement de forme survient la synthèse des prostaglandines principalement issues du métabolisme de l'acide arachidonique (*fig.* 3). Celui-ci est libéré à partir des phospholipides membranaires par la phospholipase A2, puis est transformé en endoperoxydes PGG2-PGH2 (proagrégants et vasoconstricteurs) grâce à la cyclo-oxygénase. Ils peuvent être transformés en PGE2 (vasodilatateur), PGD2 (antiagrégant mais vasoconstricteur) et PGF2 (vasoconstricteur) par des isomérases. La voie la plus importante est celle de la thromboxane synthétase : elle permet la synthèse du thromboxane A2 (TxA2) qui est vasoconstricteur et proagrégant. Instable, il se transforme en TxB2 stable mais

moins actif. Le TxA2 est proagrégant et permet ainsi le recrutement d'autres plaquettes circulantes et, par cela même, l'amplification de la réaction. En revanche, une autre enzyme, la prostacycline synthétase, assure dans la cellule endothéliale la transformation des endoperoxydes PGG2 et PGH2 en prostacycline PGI2, à action vasodilatatrice et antiagrégante (*fig. 3*).

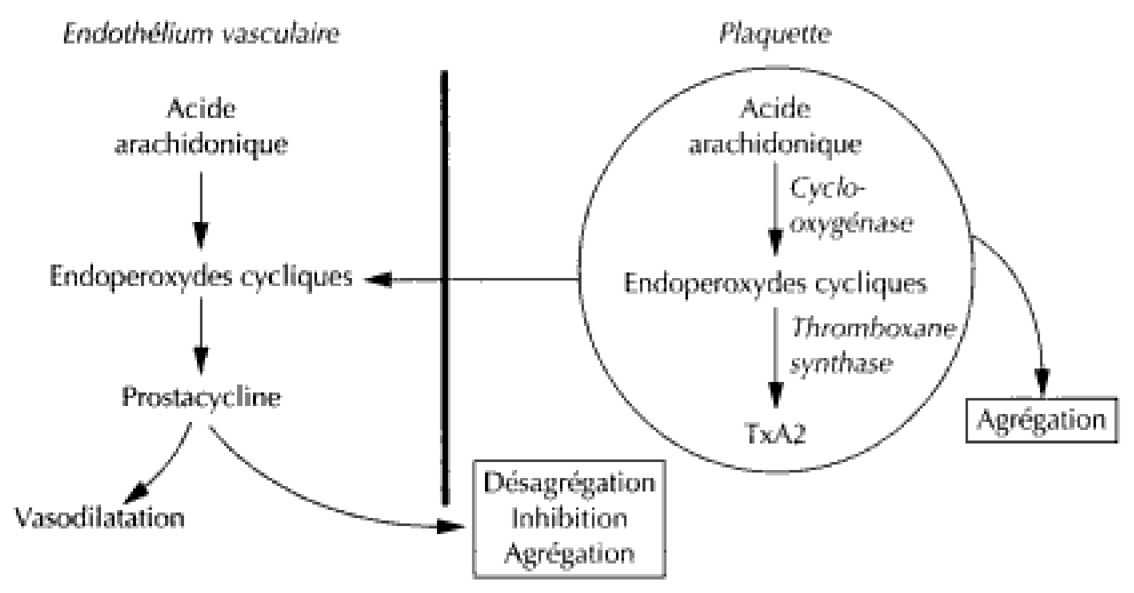



**Figure 3.** La synthèse des prostaglandines dans la cellule endothéliale et la plaquette

Sous l'influence des endoperoxydes et du TxA2, les plaquettes sécrètent le contenu de leurs granules (*tab.* 2). Une nouvelle molécule d'adhésion, la P sélectine ou GMP 140, apparaît à la surface des plaquettes, permettant leur interaction avec les leucocytes ou l'endothélium.

**Tableau 2.** Principaux constituants des granules plaquettaires

| Granules denses | Granules α | Lysosomes |
|---|---|---|
| ADP, ATP<br>Sérotonine<br>Calcium<br>Histamine | Fibrinogène<br>Facteur Willebrand<br>Facteur IV plaquettaire<br>Protéines adhésives<br>Autres protéines intervenant dans la coagulation et la fibrinolyse<br>Facteurs de croissance | Enzymes |

## C. Agrégation des plaquettes et expression de surface procoagulante

Il s'agit de l'accolement des plaquettes les unes aux autres sous l'influence des agonistes (TxA2, ADP, thrombine). À faible dose d'ADP, l'agrégation est réversible. La phase irréversible pourrait être liée à la libération d'ADP endogène à partir des granules plaquettaires, de thrombospondine et de fibronectine, qui amplifient le mécanisme d'agrégation et consolident les liens entre plaquettes. Puis, les plaquettes agrègent entre elles par l'intermédiaire de ponts entre une région spécifique du fibrinogène contenant une séquence d'acides aminés « RGD » et la GP IIbIIIa, en présence de calcium (*fig. 4*). La GP IIbIIIa est présente dans la membrane plaquettaire mais également dans celle des granules α. Aussi, au moment de la sécrétion,

phénomène qui fait intervenir des protéines plasmatiques et des supports phospholipidiques, est sous le contrôle d'inhibiteurs spécifiques, l'antithrombine et le système de la protéine C, qui évitent l'extension anormale du thrombus et la survenue d'une thrombose. Les premières traces de thrombine générées induisent un phénomène d'amplification, si bien que les événements décrits schématiquement de façon séquentielle se déroulent en fait de façon concomitante.

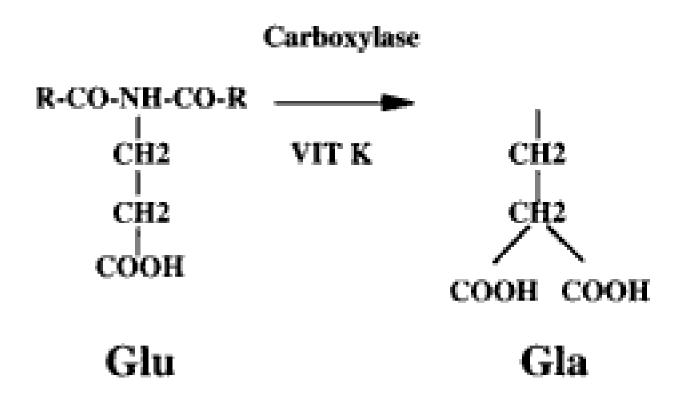



**Figure 5.** Carboxylation des résidus glutamiques des protéines de la coagulation sous l'action de la vitamine K

## B. Génération de thrombine

### 1. Complexe facteur tissulaire-facteur VIIa

Le facteur tissulaire est une glycoprotéine transmembranaire se comportant comme le récepteur des facteurs VII et VIIa. Le facteur tissulaire n'est normalement pas exprimé sur les cellules du sang. Il est démasqué lors d'une lésion endothéliale ou tissulaire, mais peut également être exprimé par les cellules endothéliales et les monocytes sous l'action des cytokines inflammatoires. La fixation du facteur VII au facteur tissulaire induit son activation en facteur VIIa par des traces de facteurs Xa, IXa, ou de thrombine et par le complexe facteur tissulaire-facteur VIIa lui-même. Le facteur tissulaire se comporte en outre comme le cofacteur du facteur VIIa, lui conférant une forte capacité activatrice vis-à-vis de ses substrats : les facteurs X et IX (*fig. 6*).
Le complexe facteur tissulaire-facteur VIIa est le principal initiateur de la coagulation responsable de la génération des premières traces de facteur Xa et donc de thrombine (voir *infra*) responsable notamment de l'activation plaquettaire. Ce processus était désigné autrefois par le terme « voie exogène » de la coagulation.

### 2. Génération du facteur Xa

L'amplification de la génération des facteurs IXa et Xa initiée par la voie du facteur tissulaire fait intervenir le système contact ou « voie endogène » de la coagulation déclenchée par l'activation du facteur XII. La fixation du kininogène de haute masse moléculaire sur une surface activatrice, le sous-endothélium mis à nu ou les plaquettes activées, permet la liaison du facteur XI et de la prékallicréine. Une modification conformationnelle du facteur XII lié lui confère la propriété d'activer la prékallicréine en kallicréine. Suit une boucle d'amplification car la kallicréine clive le facteur XII en facteur XIIa. Le facteur XIIa permet l'activation du facteur XI puis le facteur XIa protéolyse le facteur IX en présence d'ions calcium.

La vitesse d'activation du facteur X par le facteur IXa est considérablement accélérée par la formation d'un complexe enzymatique, le complexe tenase formé sur la surface des plaquettes activées. Le facteur IXa et son substrat le facteur X sont vitamine K dépendants et se lient aux phospholipides anioniques plaquettaires par des ponts calciques. Le cofacteur de la réaction est le facteur VIII activé par des traces de thrombine et libéré sur le site réactionnel par le facteur Willebrand avec lequel il forme un complexe réversible. Le facteur VIIIa se lie aux phospholipides par des liaisons hydrophobes, et se lie également à l'enzyme et au substrat dans le dessein de rapprocher les molécules dans une conformation favorable à l'activation du substrat, le facteur X.

### 3. Génération de thrombine et la boucle d'amplification de la coagulation

Un complexe similaire au complexe tenase, le complexe prothrombinase, est responsable de la génération de thrombine. Il réunit sur les phospholipides plaquettaires le facteur Xa, devenu l'enzyme, et son substrat, la prothrombine (facteur II), par des ponts calciques. Le cofacteur est le facteur V activé par des traces de thrombine. Ce facteur V n'est pas lié à une protéine de transport plasmatique mais sa forte concentration intraplaquettaire suggère son rôle *in situ* lors de l'activation plaquettaire. La thrombine a un rôle amplificateur de sa propre formation par rétroactivation des facteurs V, VIII et XI (*fig. 6*).

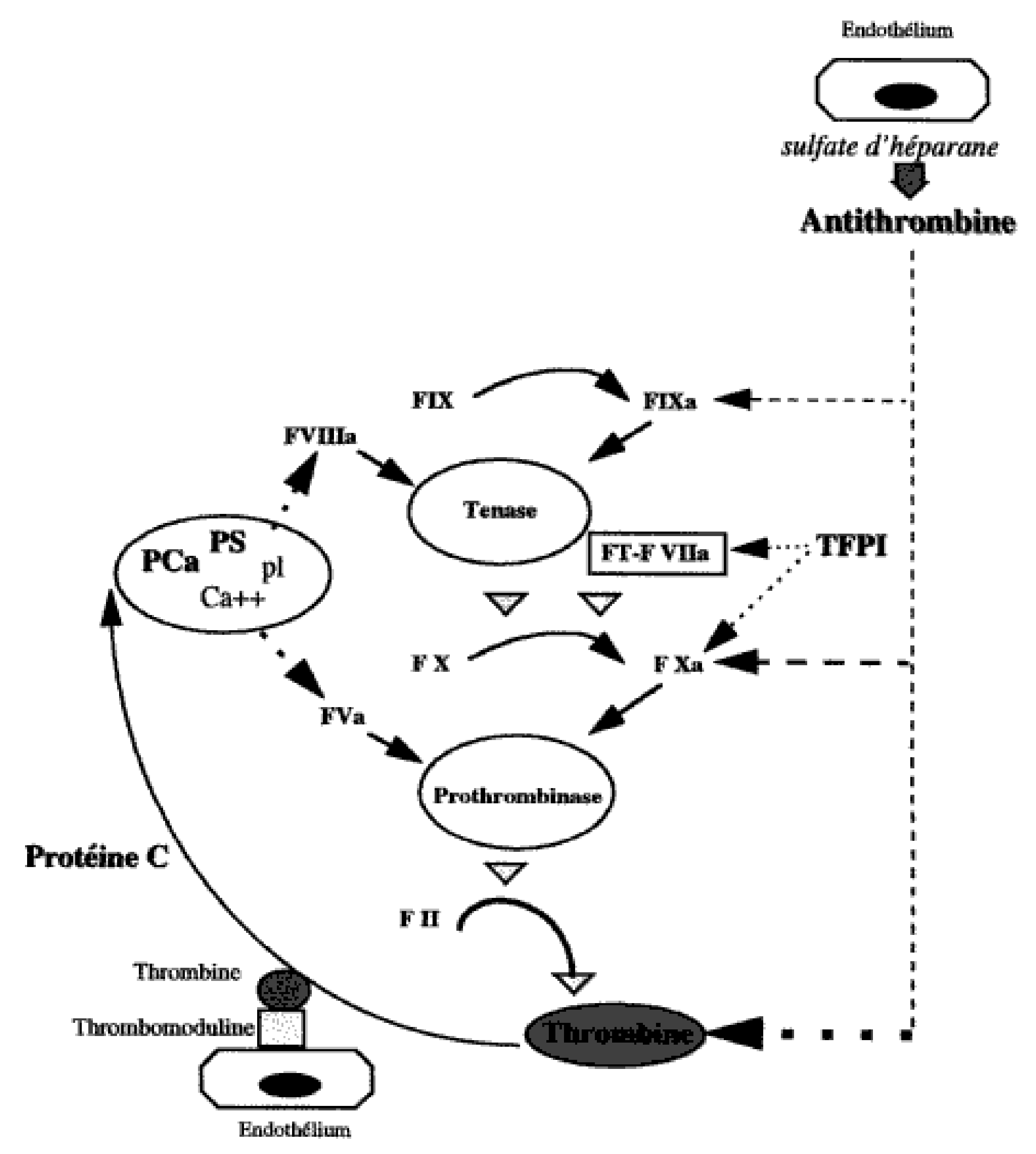
## C. Formation de fibrine

Le fibrinogène est un dimère formé de trois chaînes Aα, Bβ et γ reliées entre elles par des ponts disulfures. La thrombine protéolyse l'extrémité amino-terminale des chaînes α puis β en détachant les fibrinopeptides A et B. Les monomères de fibrine ainsi formés peuvent se polymériser entre eux grâce à des liaisons hydrogènes. Le facteur XIII activé par la thrombine lie les chaînes γ de trois monomères adjacents de façon covalente en présence d'ions calcium. Le réseau de fibrine est alors stabilisé (*fig. 7*).

## D. Régulation de la coagulation

La thrombine formée en excès se lie au réseau de fibrine qui constitue ainsi son principal inhibiteur physiologique. Toutefois, elle retrouve son activité si elle est libérée dans la circulation. Dans le plasma, l'antithrombine et le système de la protéine C sont les principaux inhibiteurs de la coagulation dont le rôle important est souligné par le fait que les sujets déficitaires dans ces protéines présentent souvent une pathologie thromboembolique. Par ailleurs, l'endothélium synthétise et sécrète des agents inhibiteurs de l'adhésion des plaquettes et vasodilatateurs (prostacycline et NO), l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et son inhibiteur spécifique, le PAI-1. Cette synthèse est stimulée par des cytokines et par l'endotoxine.

*L'antithrombine* est un inhibiteur de sérine protéases appartenant à la famille des serpines. L'antithrombine inhibe majoritairement la thrombine et, de façon plus




F = facteur, a = activé, FT = facteur tissulaire, pl = phospholipides, TFPI = inhibiteur de la voie du FT, Pca = protéine C activée, PS = protéine S.
Tenase = complexe enzymatique formé du facteur VIIIa, du facteur IXa et du substrat le facteur X en présence d'ions calcium et d'une surface phospholipidique.
Prothrombinase = complexe enzymatique formé du facteur Va, du facteur Xa et du substrat le facteur II en présence d'ions calcium et d'une surface phospholipidique.
Traits pleins = activation, traits hachurés = inhibition.

**Figure 8.** Les cibles des principaux inhibiteurs de la coagulation

## E. Méthodes d'exploration de la coagulation

L'exploration basale de la coagulation est fondée sur l'utilisation de deux examens simples et rapides à effectuer, le temps de Quick et le temps de céphaline activé, auxquels on peut ajouter le dosage du fibrinogène. Ces tests sont réalisés sur du plasma citraté.

# Conclusion

L'enzyme clé de la coagulation est la thrombine qui possède de multiples fonctions. Son rôle majeur est son action activatrice des plaquettes et procoagulante. La thrombine permet la transformation du fibrinogène en fibrine puis elle accélère sa propre formation par rétroactivation des facteurs V, VIII et XI. La thrombine intervient de façon paradoxale dans la limitation de sa génération puisque liée à la thrombomoduline. Elle permet l'inactivation des facteurs Va et VIIIa par le système de la protéine C. Enfin, le rôle de la thrombine ne se limite pas au système de la coagulation. Elle intervient dans les processus d'inflammation, de chimiotactisme, d'angiogenèse par liaison à un récepteur spécifique présent sur de nombreuses cellules.

# L'essentiel de la question

L'hémostase fait appel à une série de mécanismes impliquant les plaquettes, la paroi vasculaire et des protéines circulantes. Le premier temps de l'hémostase est un afflux de plaquettes au niveau de la brèche vasculaire qui adhèrent au tissu sous-endothélial. Cette adhésion requiert un récepteur plaquettaire, la glycoprotéine GP Ib-V-IX dont le ligand est une protéine adhésive fixée sur la matrice extracellulaire, le facteur Willebrand. L'agrégation des plaquettes est consécutive à leur activation par différents agonistes (ADP, collagène, thrombine) et se traduit par une modification d'un complexe moléculaire formé des glycoprotéines IIb et IIIa (GP IIb-IIIa) qui fixe une molécule dimérique de fibrinogène, formant un pont entre les plaquettes. Le phénomène d'agrégation est amplifié par la sécrétion par les plaquettes d'ADP, de fibrinogène et de facteur Willebrand, ainsi que par la synthèse du thromboxane A2, puissant agoniste de l'agrégation plaquettaire. La coagulation se traduit par la formation d'un réseau de fibrine. La thrombine est l'enzyme clé du système de l'hémostase. Elle est formée à partir d'un précurseur inactif, la prothrombine, par l'action d'un complexe enzymatique formé à la surface des plaquettes incluant le facteur X activé (a), le facteur Va et des ions calciques. La formation du complexe facteur VIIa-facteur tissulaire initie la formation de thrombine, relayée ensuite par la génération de facteur IXa. La coagulation est régulée par un système d'inhibiteurs physiologiques, notamment antithrombine et protéine C, dont le déficit peut se traduire par une pathologie thrombotique.

***Pour en savoir plus***


- Sampol J., Arnoux D., Boutière B. *Manuel d'hémostase*. Paris, Elsevier, « Option Bio », 1995.
- Gouault-Heilmann M. *Aide-mémoire d'hémostase*. Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 1999.

# Physiologie de la fibrinolyse

P. GAUSSEM, M. AIACH, Service d'hématologie biologique,
Hôpital européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris.
Inserm U765, Faculté de pharmacie, Université René-Descartes, Paris.

*Le processus fibrinolytique permet la lyse spécifique d'un thrombus in vivo par la plasmine, sérine-protéase issue de l'activation du plasminogène. Dans les conditions physiologiques, ce processus est localisé à la surface de la fibrine par un système complexe de régulation. Le système fibrinolytique a également été impliqué dans d'autres processus physiologiques comme la reproduction, l'embryogenèse, l'angiogenèse et, en pathologie, dans la dissémination des métastases. La plasmine est l'enzyme responsable de l'activation des métalloprotéases responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire (fig. 1). Elle est également produite par l'action d'activateurs thérapeutiques utilisés dans le traitement de la pathologie coronarienne.*

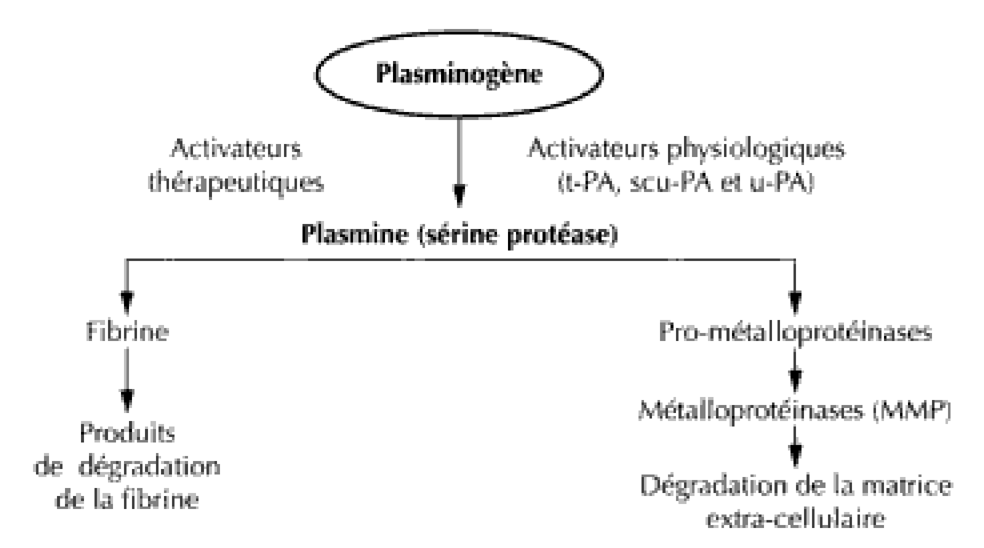



**Figure 1.** Physiologie du système fibrinolytique

# I. L'activation du plasminogène

## A. Le plasminogène

Le plasminogène est une protéine monocaténaire de MM 92 kDa, synthétisée par l'hépatocyte. Il circule sous forme de zymogène, c'est-à-dire de proenzyme à l'état inactif. La molécule dans sa structure tertiaire est formée de cinq boucles ou *kringles* (*fig.* 2). Les kringles 1 et 4 sont indispensables à la liaison du plasminogène à des protéines comportant des résidus lysine comme la fibrine et la glycoprotéine riche en histidine. Ces sites sont appelés les LBS (*lysine binding sites*). Par l'intermédiaire de ces LBS, environ la moitié du plasminogène circule sous forme d'un complexe réversible avec la glycoprotéine riche en histidine. Lors de la coagulation, une fraction du plasminogène circulant se lie à la fibrine par les mêmes sites, et se trouve ainsi incorporé au caillot. Le plasminogène peut également se lier à un récepteur spécifique cellulaire.
L'activation du plasminogène en plasmine se fait par rupture du pont peptidique Arg561-Val562 avec formation d'une protéine bicaténaire et exposition de la triade catalytique (His602, Asp645, Ser740) sur la chaîne légère carboxy-terminale. À noter que certains rares déficits constitutionnels en plasminogène se traduisent par des thromboses.

La plasmine dégrade la fibrine en produits de dégradation spécifiques, mais intervient également dans la dégradation de la matrice extracellulaire par activation du système des métalloprotéinases (MMP), principalement représentées par des collagénases (MMP-1 dans les fibroblastes, cellules endothéliales, monocytes ; MMP-8 = polynucléaires neutrophiles ; MMP-13 = tissus tumoraux) et gélatinases (MMP-2 et MMP-9). Le système est régulé par divers facteurs de croissance et par des inhibiteurs, les TIMPs. Le système des MMP intervient en physiologie dans les processus de cicatrisation, embryogenèse, angiogenèse, et en pathologie dans la pathologie athéroscléreuse, rhumatismale et dans la dissémination des métastases.

## B. Les activateurs physiologiques du plasminogène

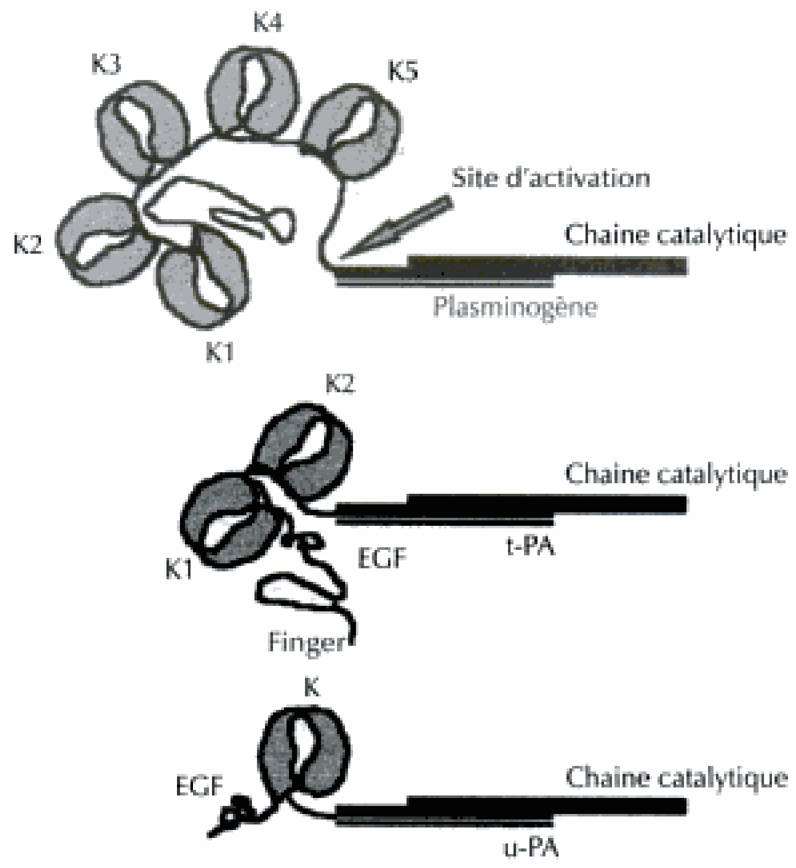
Deux principaux activateurs physiologiques du plasminogène sont décrits :

- le *t-PA* (ou *activateur tissulaire du plasminogène*) est une protéine de MM 70 kDa, synthétisée et sécrétée par les cellules endothéliales sous l'action de divers stimuli comme l'anoxie, l'exercice physique, la stase veineuse, etc. Il est libéré sous forme active. Son second domaine en boucle, le kringle 2, et le domaine en doigt (*finger*) lui confèrent une forte affinité pour la fibrine (*fig.* 2). Le t-PA active le plasminogène uniquement lorsqu'il est lié à la fibrine. En effet, lorsqu'il est libéré dans la circulation, le t-PA est immédiatement éliminé, notamment par complexation à un inhibiteur, le PAI-1 (*fig.* 3). Les structures respectives du plasminogène et du t-PA permettent ainsi la formation d'un complexe ternaire plasminogène-t-PA-fibrine et la formation de plasmine *in situ*, c'est-à-dire au niveau du caillot de fibrine ;
- l'*urokinase* (ou *u-PA, urokinase plasminogen activator*) est synthétisée sous forme monocaténaire de MM 53 kDa, la pro-urokinase ou scu-PA (*single chain u-PA*) par une grande variété de cellules (cellules épithéliales, monocytes, macrophages, etc.).

Bien que munie d'un *kringle* et d'un *finger* (*fig.* 2) la scu-PA ne possède aucune affinité pour la fibrine mais permet l'amplification de la réaction induite par le t-PA au niveau vasculaire. Les premières traces de plasmine digèrent le réseau de fibrine et de nouveaux sites de liaison pour le plasminogène sont exposés. Le plasminogène plasmatique qui se lie à ces nouveaux sites subirait une modification conformationnelle qui le rendrait apte à lier la scu-PA. Cette scu-PA est ensuite activée en u-PA active bicaténaire sous l'effet de la plasmine, créant ainsi une boucle d'amplification.

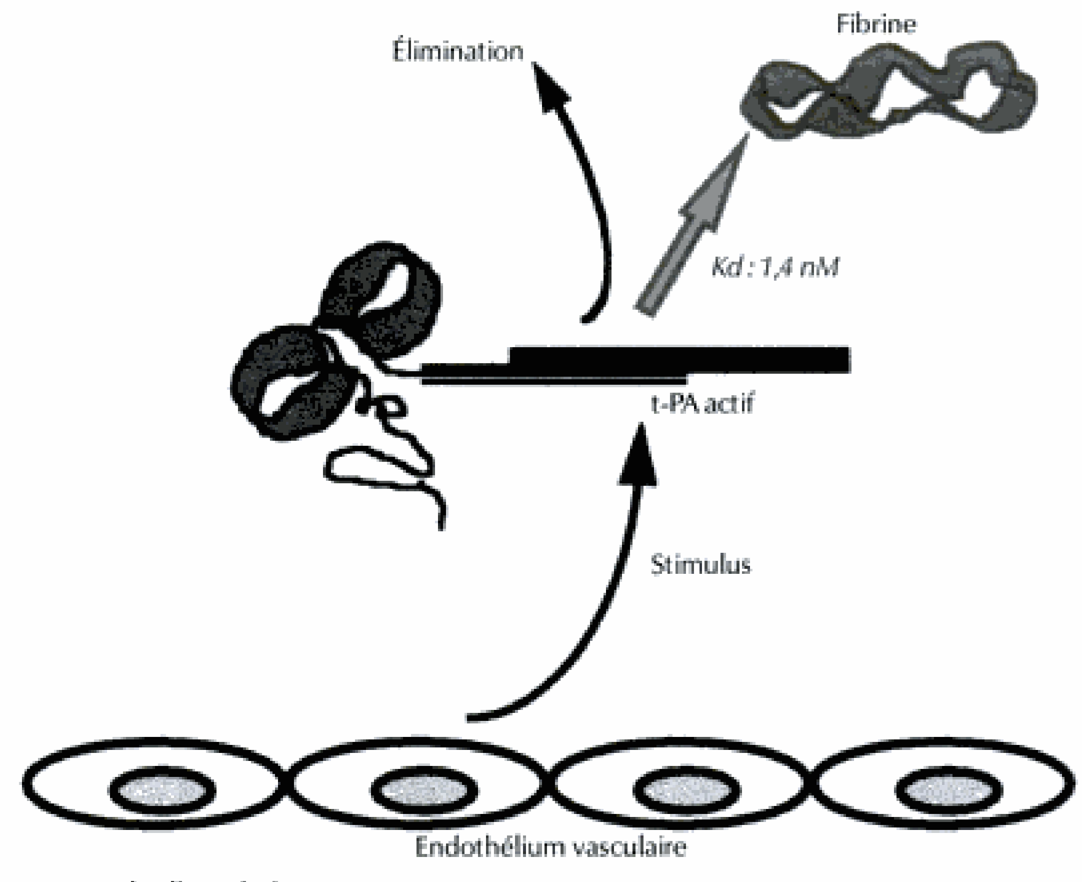
De nombreuses cellules possèdent des récepteurs pour la scu-PA (monocytes, macrophages, etc.). Le rôle de la scu-PA a ainsi été démontré dans la fibrinolyse extravasculaire : migration cellulaire, cicatrisation et dissémination des métastases en pathologie.

Une troisième voie d'activation de la fibrinolyse, dont l'importance physiologique n'est pas parfaitement élucidée, met en jeu le *système contact* : kallicréine, facteurs XI activé (a) et XIIa. Il semble qu'au niveau de la surface cellulaire, le facteur XIIa active la prékallicréine en kallicréine qui permet l'activation de la scu-PA en u-PA.




K : domaine kringle. EGF : domaine de type *epidermal growth factor.*

**Figure 2.** Structures comparatives du plasminogène, du t-PA et de l'u-PA




Kd : constante de dissociation

**Figure 3.** Représentation schématique du mécanisme d'action du t-PA.

### B. Les inhibiteurs des activateurs du plasminogène : les PAIs

Il s'agit essentiellement du PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor* de type 1), serpine synthétisée par une grande variété de cellules : endothélium, hépatocytes, mégacaryocytes, cellules tumorales, etc. Le PAI-1 inhibe le t-PA et l'u-PA en formant des complexes inactifs ($K2 = 10^7\ M^{-1}\ s^{-1}$). Comme le PAI-1 circule en grand excès dans le plasma, le t-PA libéré par les cellules endothéliales est immédiatement neutralisé s'il n'est pas lié à la fibrine. Ainsi, aucune activité fibrinolytique circulante n'est retrouvée physiologiquement. Pendant la grossesse, le placenta synthétise un autre inhibiteur, le PAI-2.
Le PAI-1 à taux élevé pourrait contribuer à la récidive d'accidents thromboemboliques artériels. Il existe des rares déficits sévères en PAI-1 qui sont responsables d'un syndrome hémorragique.

### C. L'inhibition de la liaison du plasminogène à la fibrine

Le TAFI (*thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor*) clive les résidus lysine C-terminaux de la fibrine et inhibe ainsi la liaison de molécules de plasminogène sur le réseau de fibrine. Il est activé par la thrombine.
En pathologie, la lipoprotéine Lp(a) possède dans sa structure de multiples copies d'un kringle du plasminogène. En quantité anormalement élevée dans le plasma, elle peut se lier à la surface de la fibrine à la place du plasminogène et donc interférer dans le processus de fibrinolyse.

## III. L'exploration de la fibrinolyse

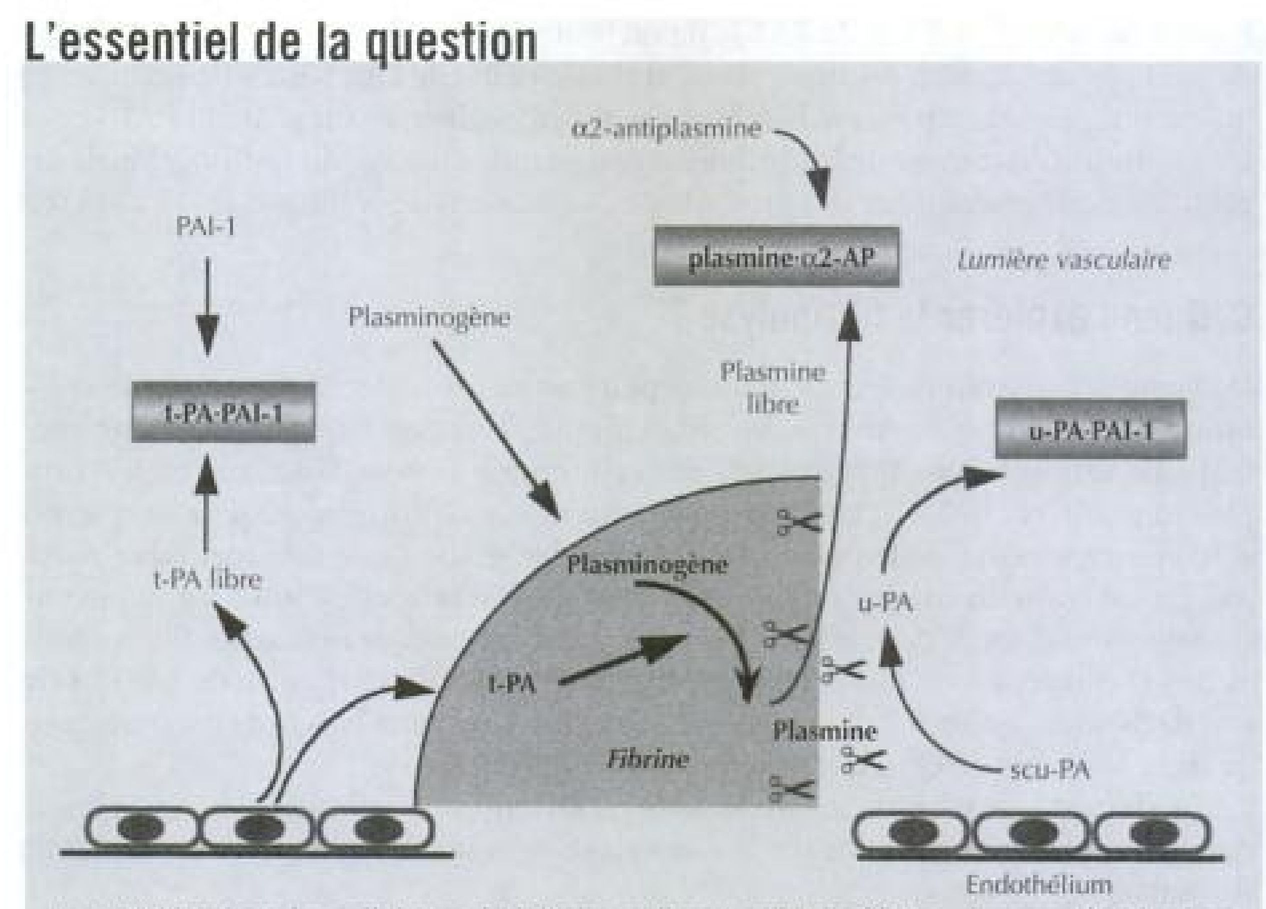
### A. Tests globaux

Ces tests sont historiques pour la plupart, comme le temps de lyse d'un caillot de sang total. Le temps de lyse des euglogulines, ou test de von Kaulla, est parfois encore utilisé. Il s'agit du temps de lyse d'un caillot formé à partir d'une fraction protéique du plasma contenant tous les activateurs de la fibrinolyse mais dépourvue de ses inhibiteurs. Le temps de lyse de ce caillot à 37 °C est donc considérablement raccourci (2 heures contre 72 heures pour la lyse du caillot de sang total).

### B. Tests analytiques

Les protéines de la fibrinolyse peuvent être dosées antigéniquement par une technique de type ELISA ou par mesure de leur activité. Les mesures d'activité sont pour la plupart basées sur une mesure chromogénique de la plasmine. À titre d'exemple, pour le dosage du plasminogène, c'est la plasmine formée après ajout d'un activateur qui est mesurée. Pour le dosage de l'α2-antiplasmine, c'est la plasmine résiduelle qui est mesurée après ajout d'un excès de plasmine. Il est ainsi possible de mesurer éga-

## L'essentiel de la question




Le t-PA libéré par les cellules endothéliales se lie au caillot de fibrine. Il permet l'activation du plasminogène incorporé au caillot. Les premières traces de plasmine formées dégradent la fibrine et de nouveaux sites de liaison du plasminogène apparaissent. La scu-PA agit en synergie avec le t-PA, c'est-à-dire qu'elle amplifie et prolonge son action, bien qu'elle ne se lie pas à la fibrine. Toute trace de plasmine libre est neutralisée par l'α2-antiplasmine. Toute trace de t-PA ou d'u-PA libres est neutralisée par le PAI-1.

**Figure 5.** Schéma global du système fibrinolytique

### *Pour en savoir plus*


- Sampol J., Arnoux D., Boutière B. *Manuel d'hémostase*. Paris, Elsevier, « Option Bio », 1995.
- Gouault-Heilmann M. *Aide-mémoire d'hémostase*. Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 1999.
- Anglés-Cano E. Activation du plasminogène et activité protéolytique péricellulaire des leucocytes. *Hématologie* 1996, 2 : 377-86.

# Groupes sanguins : systèmes ABO et rhésus

E. PELISSIER, A. FRANÇOIS, B. JAULMES
Site transfusionnel, Hôpital Saint Vincent de Paul, Paris.

# I. Système ABO

Découvert par Karl Landsteiner en 1900, le système ABO est le groupe sanguin le plus important en raison de :
- la présence constante d'anticorps naturels correspondants aux antigènes absents à la surface du globule rouge, cette notion dictant les règles de compatibilité transfusionnelle ;
- la distribution très étendue de ces antigènes présents dans la plupart des tissus de l'organisme imposant le strict respect des compatibilités ABO pour les transplantations ;
- la connaissance de la nature biochimique des antigènes A et B.

## A. Phénotypes courants

Ils sont par convention définis par le ou les antigènes présents à la surface des globules rouges qui donnent leur nom au groupe :
- si l'antigène A est seul présent sur le globule rouge, le sujet est dit de groupe A ;
- si l'antigène est seul présent sur le globule rouge, le sujet est dit de groupe B ;
- si les deux antigènes A et B sont présents sur le globule rouge, le sujet est dit de groupe AB ;
- si aucun des deux antigènes ne sont présents sur le globule rouge, le sujet est dit de groupe O.

L'anticorps correspondant à l'antigène absent du globule rouge est toujours présent dans le sérum :
- ainsi le sérum du sujet de groupe A contient toujours un anti-B ;
- le sérum du sujet de groupe B contient toujours un anti-A ;
- le sérum du sujet de groupe AB ne contient aucun anticorps ;
- le sérum du sujet de groupe O contient toujours un anti-A + anti-B.

Le groupage ABO est toujours réalisé par deux méthodes : détermination du ou des antigènes globulaires et détermination du ou des anticorps sériques.
Ce n'est, comme nous le reverrons, que la stricte concordance entre les deux épreuves qui permet de définir les phénotypes (*tab. 1*).

**Tableau 1.** Antigènes et anticorps du système ABO, ainsi que leur fréquence

| Antigène globulaire | Anticorps sérique | Groupe | Fréquence en France |
|---|---|---|---|
| A, | anti-B | A | 45 % |
| ni A, ni B | anti-A + anti-B | O | 43 % |
| B | anti-A | B | 9 % |
| A et B | aucun | AB | 3 % |

Il est à noter que le groupe A est constitué de deux sous-groupes, A1 et A2 (80 % des A étant A1), très peu différents l'un de l'autre. L'intérêt pratique de la distinction entre A1 et A2 tend à diminuer, mais leur étude permet une meilleure connaissance du système ABO.

## B. Les antigènes

### 1. Génétique (transmission mendélienne)

Il existe quatre allèles pour un même gène, deux allèles codant pour le groupe A (A1 et A2), un allèle codant pour le groupe B, un allèle silencieux codant pour le groupe O. Les allèles A et B sont codominants situés sur le chromosome 9. Le gène silencieux O doit être en double dose pour s'exprimer. Les quatre allèles définissent ainsi les génotypes et phénotypes (*tab. 2*).

**Tableau 2.** Génotypes et phénotypes du système ABO et leur fréquence

| Génotypes | Phénotypes | Fréquence en Europe Occidentale |
|---|---|---|
| A1/A1<br>A1/A2<br>A1/0 | A1 | 36 % |
| A1/B | A1B | 2,4 % |
| A2/A2<br>A2/0 | A2 | 9 % |
| A2B | A2B | 0,6 % |
| B/B<br>B/0 | B | 9 % |
| 0/0 | 0 | 43 % |

### 2. Biochimie

Les gènes du système ABO codent pour des enzymes qui sont des glycosyltransférases. Chaque allèle produit une enzyme spécifique capable de fixer un sucre spécifique sur une structure précurseur :

- le sucre spécifique de A est une N-acétylgalactosamine fixée par une N-acétylgalactosamine transférase codée par l'allèle A (A1 et A2 codent pour des enzymes de même spécificité mais qui ont quelques différences de comportements biochimiques : PHI, substrat plus ou moins ramifié, quantité de substance de base transformée). D'autre part, il a été démontré que le gène A code pour une enzyme agissant sur une substance de base supplémentaire qui est une Gal N-acétylgalactosamine ;
- le sucre spécifique de B est un galactose fixé par une galactosyltransférase codée par l'allèle B ;
- la représentation biochimique des antigènes du système ABO est présentée dans la *figure 1* ;
- sur un globule rouge, il y a donc des chaînes plus ou moins ramifiées, plus ou moins substituées. Ainsi, un sujet A exprime encore un peu de H. Si un sujet possède le gène AB, il produit les deux enzymes, le globule rouge aura alors des chaînes A et des chaînes B. Ces chaînes sont synthétisées par les cellules de l'organisme à l'exception des hépatocytes, du tissu conjonctif, des cellules de Malpighi, de l'os et de la cornée. Elles sont sécrétées dans le plasma et de nombreux liquides biologiques, dont la salive où le caractère sécréteur est sous la dépendance du système d'allèle Se/se.

**Tableau 3.** Principaux caractères de phénotypes A courants et A faible

| Phénotypes | Détermination pratique des groupes sanguins | | | | | | | | | Pourcentage d'agglutination | Substances solubles* | | Transmission |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Globules rouges | | | | | | Sérum | | | | nature | rapport A/H | |
| | anti-B | anti-A | anti-A + B | anti-$A_1$ | anti-H | anti-$A_{HP}$ | $A_1$ | $A_2$ | B | | | | |
| $A_1$ | – | + + + | + + + | + + | – | + + + | – | – | + + + | 95 ± 3 | A,H | 1,1 ± 1,2 | dominante |
| $A_2$ | – | + + + | + + + | – | + + + | + + + | – | – | + + + | 90 ± 5 | A,H | 2,1 ± 0,5 | dominante |
| $A_3$ | – | ± ± ± | ± ± | – | + + + | + | + ou – | – | + + + | 61 ± 10 | A,H | 1,2 ± 0,5 | dominante |
| $A_x$ | – | (+) | + | – | + + + | – | – | – | + + + | 33 ± 10 | $(A_x)$,H | 0,5 | dominante |
| $A_{end}$ | – | ± | ± | – | + + + | – | + ou – | – | + + + | 10 ± 5 | H | | dominante |
| $A_m$ | – | – | – | – | + + + | – | – | – | + + + | 0 | A,H | 1,2 ± 1,0 | dominante |
| $A_y$ | – | – | – | – | + + + | – | – | – | + + + | 0 | (A),H | 0,5 ± 1,0 | récessive |
| $A_{el}$ | – | – | – | – | + + + | – | + + ou – | – | + + + | 0 | H | | dominante |

± ± ou ± = double population ; (+) : faible agglutination ; (A) : substance A hydrosoluble très faible détectée dans la salive des sujets Ay ; (Ax) : substance A détectée dans la salive des sujets Ax par inhibition de leurs propres globules ; anti AHP : lectine d'Helix pomatia ; x = dans des conditions standards.

* Chez les sécréteurs.

D'après Rouger et Salmon.

de transmettre leur gène A ou B à leurs enfants. Des arbres généalogiques surprenants ont permis de bien comprendre le système (*fig.* 2).

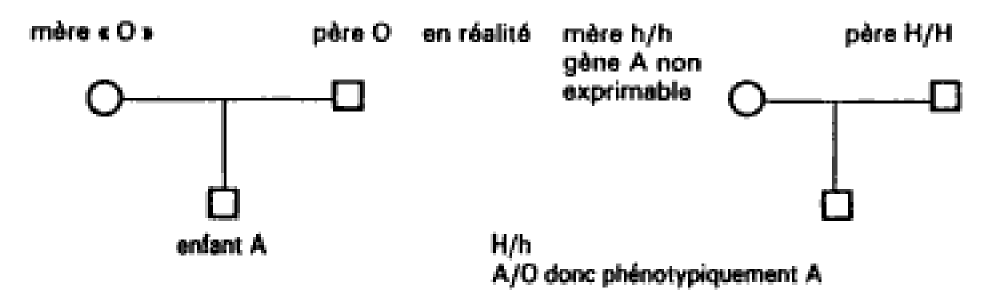



**Figure 2.** Enfant de groupe A issu d'une mère Bombay et d'un père O

### c) Bombay intermédiaires

C'est un variant génétique de H, correspondant à H faible. Le peu de substance H produite est immédiatement substitué en A ou B. Ces globules ont donc une réaction faible avec anti-A et anti-B mais n'ont pas de substance H.

### d) Cas particuliers du cis AB

Après crossing-over intragénique, certains sujets expriment un allèle à la fois A et B, en position cis, pouvant être associé à un autre haplotype A, B et O sur l'autre chromosome. De nouveau, des arbres généalogiques surprenants peuvent être rencontrés (*fig.* 3).

## C. Anticorps

### 1. Anti-A et anti-B

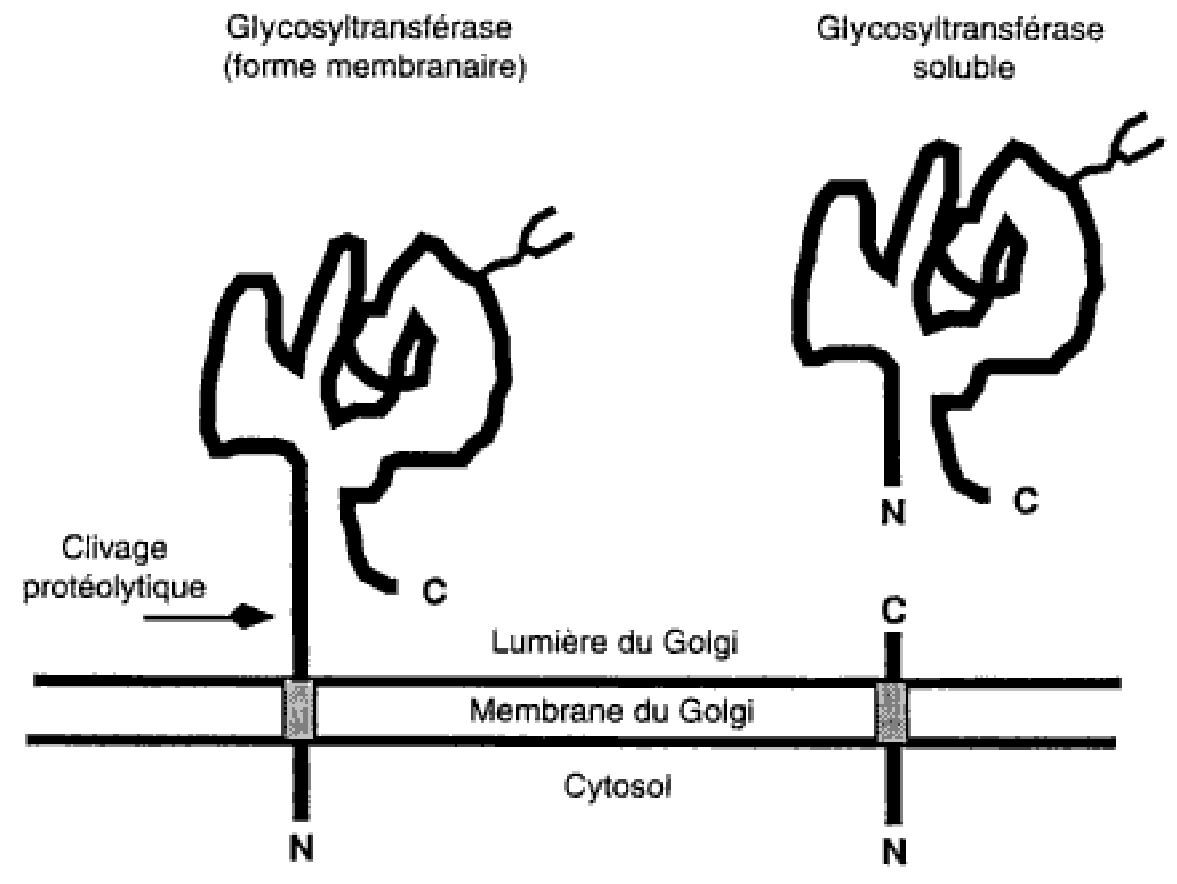
Ils sont *naturels*, c'est-à-dire existants en l'absence de toute immunisation évidente, et *réguliers*, c'est-à-dire constants chez tous les individus. Ce sont des IgM actifs surtout à froid (4° et 22°). Ils apparaissent dans les *six premiers mois de la vie*

# Génétique moléculaire des systèmes ABO de groupes sanguins humains

M. LENTZY, EFS, Île-de-France, site Hôpital européen Georges Pompidou (HEGP).

*Les différents gènes sont situés sur les loci suivants :*
- *le gène ABO est situé sur le chromosome 9 ;*
- *les gènes H/h et Se/se sont étroitement liés sur le chromosome 19 ;*
- *le gène Le est également situé sur le chromosome 19, lié avec le gène du C3.*

*Ces gènes codent tous pour des enzymes membranaires résidentes de l'appareil de Golgi de type 2, c'est-à-dire avec une très courte queue cytoplasmique (environ 15 AA), un segment transmembranaire unique (environ 25 AA), le reste, soit 320 AA environ, représentant le site actif. Ces enzymes ont la faculté de transporter les sucres de manière séquentielle sur des substrats donnés. L'enzyme A transfère de la N-acétylgalactosamine sur la substance H et l'enzyme B du galactose sur ce même substrat (fig. 1).*




Les protéines transmembranaires de *type II* maintiennent les parties aminoterminales (N) cytosoliques et les domaines carboxyterminaux (C) à l'extérieur de la cellule ou, dans le cas des glycosyltransférases de mammifères, à l'intérieur de la lumière de l'appareil de Golgi. Les glycosyltransférases sont ancrées dans la membrane de l'appareil de Golgi par de courts domaines transmembranaires hydrophobes (hachures). Les transférases A et B possèdent un seul site potentiel de N-glycosylation, ce qui indique que ces enzymes sont des glycoprotéines. Des glycosyltransférases solubles, catalytiquement actives, sont produites par clivage protéolytique libérant le domaine catalytique de son domaine intramembranaire.

**Figure 1.** Topologie transmembranaire des glycosyltransférases de groupe sanguin ABO

# I. Gènes du système ABO

Il s'agit des gènes :
- de la N-acétylgalactosamine transférase pour le *groupe A1* ;
- de la galactose transférase pour le *groupe B*.

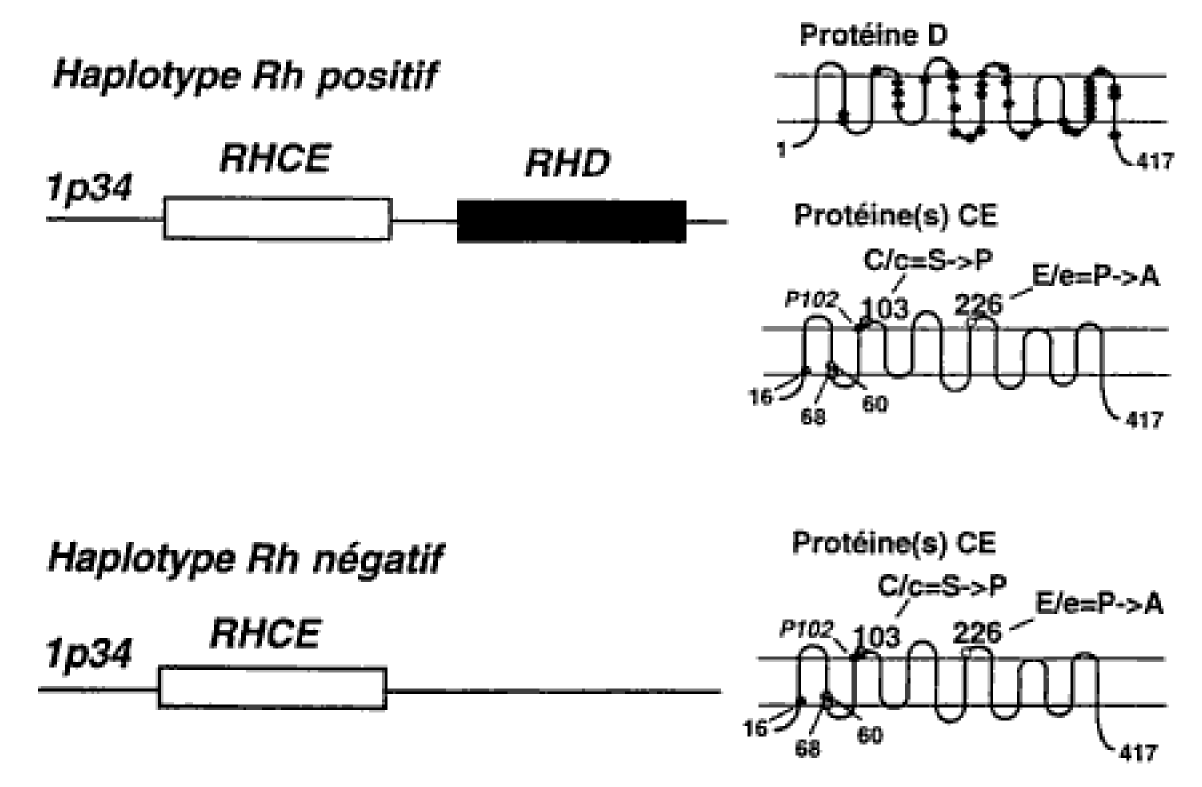
Ces deux gènes sont des allèles qui comprennent sept exons. Les différences de séquence nucléotidique portent sur sept bases qui rendent compte de quatre changements d'AA :
- en 176 Arg pour A Gly pour B ;
- en 235 Gly pour A Ser pour B ;
- en 266 Leu pour A Met pour B ;
- en 268 Gly pour A Ala pour B.

Les positions 266 et 268 semblent les plus importantes sur le plan fonctionnel.
Actuellement, un certain nombre d'allèles « rares » sont en cours de caractérisation, en particulier les *A* et *B faibles*.
L'allèle *cis-AB* correspond *a priori* à une enzyme mutée unique possédant les deux activités enzymatiques mais sous forme atténuée.
Jusqu'à présent, deux types principaux de *0* ont été découverts. Chez l'un (*01*), il s'agit à l'origine d'un gène A1 dont la traduction s'arrête à cause d'une mutation modifiant le cadre de lecture par apparition prématurée d'un codon STOP. Chez l'autre (*02*), c'est une enzyme inactive qui porte une mutation au niveau de la région catalytique. Dans ce dernier cas, on a pu mettre en évidence la présence d'un CRM (*cross reacting material*) correspondant à l'enzyme mutée, au moyen de tests d'immunoprécipitation utilisant un antisérum animal obtenu après immunisation par une glycosyl transférase A humaine *active*.
L'allèle *A2* diffère de A1 par une délétion des trois nucléotides terminaux qui aboutit à la suppression du codon STOP normal et à la prolongation de cette enzyme de 21 AA. Cela rendrait l'enzyme moins efficace pour transférer la Gal-Nac sur tous les types de substrats H possibles, ramifiés ou linéaires.
Des minisatellites répétés situés à proximité de la région de régulation de la transcription des gènes ABO ont récemment été mis en évidence. Comme ils possèdent une variation allélique, cela permettrait un diagnostic VNTR (*variable number of tandem repeats*, séquences répétées en tandem) des allèles ABO (*fig.* 2 et 3).

# II. Gènes des fucosyltransférases ou gènes FUT

## A. Gènes H/h et Se/se

Il s'agit d'une paire de gènes de α(1,2)L-fucosyltransférases situés en contiguïté sur le même chromosome et qui ont des spécificités de substrat assez différentes :
- l'enzyme codée par le locus *H* agit exclusivement sur un substrat de type 2 (Gal1-4GlucNac). Le gène ne s'exprime que dans la lignée érythroïde du tissu hématopoïétique, dans l'épiderme et les neurones sensoriels (SNP) ;




Structure schématique des haplotypes Rh positif et Rh négatif sur le chromosome 1 humain (1p34-p36). Le gène RHD (noir) est situé en aval du gène RHCE (blanc). Le produit du gène RHD est une protéine membranaire composée de 417 acides aminés qui diffère des protéines non-D par 35 substitutions en acides aminés (symboles pleins). Le produit principal du gène RHCE est une protéine homologue à la protéine D dont le polymorphisme Ser(S)/Pro(P) en position 103 détermine la spécificité C/c, et le polymorphisme Pro(P)-Ala(A) en position 226 détermine la spécificité E/e. Les spécificités C/c et E/e sont portées par une molécule unique, mais existeraient aussi sur des isoformes distinctes. La présence d'une proline (P) en position 102 est critique pour l'expression antigénique c. Des polymorphismes en positions 16, 60 et 68 sont fréquemment associés aux phénotypes C, et c.

**Figure 4.** Représentation schématique du locus RH et des protéines D et non-D

sujets présentent une duplication interne de 37 paires de bases insérées dans l'exon 4. Sa présence génère l'apparition prématurée d'un codon STOP en 210 et d'un autre dans l'exon 6. Chez les Japonais, les rares sujets RHD négatifs correspondent soit à des individus où le gène D est absent (type « européen »), soit à une délétion du gène de 1 013 paires de bases.

Des variations dans l'expression antigénique de RHD définissent des phénotypes affaiblis où l'antigène D réagit avec tous les réactifs anti-D mais avec des intensités variables : ce sont les phénotypes *D faibles* (anciennement Du). En fait, un certain nombre d'individus possédant ce phénotype ont été trouvés porteurs de mutations dans les régions variables du gène RHD. L'assemblage du complexe RH en serait inhibé, ce qui aboutirait à un très faible niveau d'apparition de la protéine D sur la membrane qui conserve cependant une spécificité antigénique D intacte. Certains D partiels expriment une faible antigénicité du même ordre.

Il existe des individus de phénotype D+ mais qui ne sont pas reconnus par l'intégralité des réactifs anti-D et surtout qui peuvent fabriquer un authentique alloanticorps anti-D. On admet que ces individus possèdent une partie seulement de la mosaïque antigénique D et qu'ils s'immunisent contre la portion qui leur manque :

*Protéines supportant des antigènes de groupe et appartenant à la superfamille des immunoglobulines*

LW : homologue de ICAM-2.

Luteran® : isoforme par épissage alternatif d'une molécule d'adhésion cellulaire.

Xg : (porté par le chromosome X) parenté avec ICAM-1.

Un certain nombre d'antigènes de groupes sanguins jouent un rôle de récepteur pour certains agents pathogènes (*tab.* ci-dessous).

| Ag de groupe sanguin | Micro-organisme |
|---|---|
| P | *Escherichia coli Parvovirus* B19.9 |
| Lewis (Leb) | Helicobacter pylori |
| AH + autres oligosaccharides | Candida albicans |
| M/N (GPA) | Plasmodium falciparum |
| DAF ou CD55 | E. coli Echovirus |
| CD44 | Poliovirus haemophilus influenzae |
| Duffy | Plasmodium vivax |

C'est la présence de variants génétiques des groupes sanguins (induisant l'allo-immunisation et la fabrication d'anticorps) qui a permis d'élucider les structures et les fonctions de nombreux composants de la membrane érythrocytaire. Paradoxalement, les structures non antigéniques au sein de notre espèce nous demeurent beaucoup plus difficiles d'accès *(*I/i, etc.). En outre, l'apparition et la répartition géographique de certains variants ont permis de vérifier que la sélection naturelle s'exerçait également sur les populations humaines *(*Fy et *P. vivax).*

a. CALLA : *common acute lymphoblastic leukemia-associated antigen.*

### *Pour en savoir plus*


- Cartron J.-P., Rouger Ph. *Bases moléculaires des antigènes des groupes sanguins. De l'immunologie à la biologie cellulaire.* Paris, Masson, 1998.
- Lefrère J.-J., Rouger Ph. *Transfusion sanguine : une approche sécuritaire.* Paris, John Libbey Eurotext, 2000 : 203-243.

# Hématologie clinique

*Les anémies sont des pathologies fréquentes auxquelles biologistes et praticiens sont confrontés presque quotidiennement. Elles diffèrent par leur tableau biologique, leur mécanisme physiopathologique, leur étiologie et leur pronostic.*
*L'anémie doit être définie exclusivement par une diminution de l'hémoglobine circulante. L'hémogramme de base, réalisé dans de bonnes conditions techniques, permet dans la majorité des cas une orientation diagnostique précise. La connaissance de la physiopathologie doit permettre de limiter les examens complémentaires nécessaires au diagnostic étiologique.*

# I. Examens de première intention nécessaires au diagnostic

## A. Hémogramme

C'est un examen fondamental, et de sa qualité dépend toute l'orientation diagnostique ultérieure. L'hémogramme est effectué soit sur sang veineux après prélèvement au pli de coude, soit sur sang capillaire par ponction de l'extrémité du doigt ou du talon chez le jeune enfant.
La plupart des appareils mesurent automatiquement le taux d'hémoglobine, l'hématocrite, le nombre de globules rouges et calculent les constantes érythrocytaires. La formule leucocytaire, réalisée en méthode manuelle, doit s'accompagner d'une étude de la morphologie des hématies sur frottis coloré au May-Grünwald-Giemsa (MGG). L'hémogramme permet :

- d'affirmer l'anémie et de chiffrer son importance sur la diminution du taux d'hémoglobine circulante. Il y a anémie lorsque ce taux est inférieur à 13 g pour 100 ml chez l'homme, à 12 g pour 100 ml chez la femme et l'enfant. Ne pas oublier que certaines variations du volume plasmatique peuvent simuler une anémie – éliminer les fausses anémies par hémodilution (grossesse). À l'inverse, une anémie peut être masquée par une hémoconcentration ;
- de préciser le type d'anémie. Le volume globulaire moyen, calculé à partir de l'hématocrite (l/l) et du nombre de globules rouges, permet de séparer les anémies en microcytaires, normocytaires ou macrocytaires ;
- il est important d'individualiser les anémies microcytaires des autres types. Elles sont fréquentes à tout âge de la vie et relèvent d'un mécanisme commun qui est une insuffisance de synthèse de l'hémoglobine. La mesure du volume globulaire donnant un résultat inférieur à 80 $\mu^3$, ou fl, permet de porter ce diagnostic.

## B. Numération des réticulocytes

Le décompte des réticulocytes, interprété en valeur absolue (pourcentage × nombre de globules rouges), permet d'affirmer le caractère régénératif de l'anémie et de séparer les anémies de causes périphériques, qui sont toujours régénératives, des anémies de causes centrales où les réticulocytes sont normaux ou diminués.

# II. Anémie microcytaire

La microcytose affirme une anomalie de synthèse de l'hémoglobine dans les érythroblastes. Il s'agit :

- soit d'une anomalie du métabolisme du fer ;
- soit d'un trouble de l'incorporation du fer dans une hémoglobine pathologique.

L'examen complémentaire indispensable est représenté par le dosage du fer sérique auquel il faut joindre celui de la capacité totale de fixation de la transferrine. Le coefficient de saturation de la transferrine est calculé à partir de deux paramètres.

Fer sérique :

- homme 16 à 28 µmol/L ;
- femme 13 à 25 µmol/L ;

et transferrine :

- 2,0 à 3,5 g/L.

$$\frac{\text{Fer sérique } (\mu\text{mol/L})}{\text{Transferrine (g/L)} \times 4} = \text{Coefficient de saturation} = 30 \text{ à } 40\ \%.$$

Selon les résultats de ces dosages, on peut distinguer plusieurs cas.

## A. Fer sérique abaissé, coefficient de saturation de la transferrine élevé : anémies microcytaires par carence martiale

Fréquentes à tous les âges de la vie, les anémies par carence martiale peuvent être dues à un défaut d'apport alimentaire en fer (surtout chez le jeune enfant) ou à des pertes de sang répétées souvent méconnues entraînant à la longue une déplétion martiale.
Le diagnostic repose sur les données de l'hémogramme et les dosages du fer. L'anémie est d'intensité variable, souvent importante avec microcytose franche (≤ 80 fl), une teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) < 27 pg et une concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) abaissée. Le frottis sanguin met en évidence la microcytose et les anomalies morphologiques des globules rouges traduisant l'hypochromie (hématies décolorées au centre, annulocytes).
Le fer sérique est abaissé, le coefficient de saturation de la transferrine est augmentée car, par un mécanisme régulateur, il y a augmentation de la synthèse de sidérophiline. Le dosage de la ferritine sérique montre une diminution des réserves en fer.
Le diagnostic de l'anémie pose en général peu de problèmes, et le myélogramme est inutile. En revanche, chez l'adulte, il est indispensable, si la cause du saignement n'est pas évidente, de faire appel aux techniques d'exploration endoscopique afin de ne pas méconnaître une néoplasie digestive.

## B. Fer sérique et coefficient de saturation de la transferrine abaissés : anémies inflammatoires

Les étiologies sont nombreuses et toute affection s'accompagnant de façon prolongée d'un syndrome inflammatoire peut être responsable de l'installation d'une anémie : infections chroniques, néoplasies, maladies inflammatoires diverses.
La physiopathologie de l'anémie est complexe : le trouble du métabolisme du fer est représenté par une séquestration du fer dans les macrophages et par une diminution du taux de la sidérophiline dont la synthèse est diminuée.
L'anémie est le plus souvent normochrome normocytaire et devient microcytaire, hypochrome, au cours des états inflammatoires sévères et prolongés. L'hypochromie est modérée, et le volume globulaire moyen (VGM) reste à 75 fl. Le fer sérique est abaissé, le coefficient de saturation est normal, la ferritine sérique est normale ou augmentée, un syndrome biologique inflammatoire est présent et constitue un argument pour le diagnostic (vitesse de sédimentation accélérée, augmentation du fibrinogène, des $\alpha_2$, et $\gamma$-globulines). Le seul traitement est celui de l'affection responsable.

## C. Fer sérique normal ou augmenté

Après avoir contrôlé le dosage du fer sérique, deux étiologies sont à envisager :
- les $\beta$-thalassémies ;
- les anémies sidéroblastiques, beaucoup plus rares.

### 1. $\beta$-thalassémies

Dans sa forme majeure, le diagnostic pose peu de problèmes, la maladie se révèle dès l'enfance par des troubles graves. L'anémie est microcytaire très hypochrome avec des anomalies morphologiques intenses des globules rouges (cellules cibles, poïkilocytose). À l'électrophorèse, le dosage de l'hémoglobine fœtale (HbF) est supérieur à 60 %. Le fer sérique et le coefficient de saturation de la transferrine sont augmentés.
La $\beta$-thalassémie mineure est le plus souvent diagnostiquée chez l'adulte. Fréquente dans les pays méditerranéens, elle est asymptomatique et se révèle lors d'une grossesse ou d'une infection. L'hémogramme révèle une pseudopolyglobulie microcytaire. L'hémoglobine est discrètement abaissée, le fer sérique est normal. Le diagnostic est confirmé par une élévation de l'$HbA_2$, ou de l'HbF à l'électrophorèse.

### 2. Anémies sidéroblastiques

Peu fréquentes, ces anémies se rencontrent chez l'enfant ou chez l'adulte jeune dans un contexte familial, ou sont consécutives à des intoxications (saturnisme, médicaments antituberculeux). L'anémie est hypochrome microcytaire.
Le diagnostic est affirmé par la découverte d'une dysérythropoïèse au myélogramme avec présence de sidéroblastes, et les dosages de plombémie et plomburie dans le cas de saturnisme.

# Les anémies par carence en fer

F. DOUTREMÉPUICH, Laboratoire d'hématologie, UFR de pharmacie, Bordeaux.

*Les anémies par carence en fer, ou anémies ferriprives, sont fréquentes et observées à tous les âges de la vie. Chez l'adulte, la carence martiale est la première cause des anémies rencontrées en pratique générale dans nos régions. Elle est, dans la majorité des cas, secondaire à des hémorragies latentes. Chez le jeune enfant jusqu'à 3 ans, les anémies ferriprives sont les plus fréquentes et représentent même les hémopathies les plus habituelles en pédiatrie.*
*Sur le plan biologique, ce sont des anémies microcytaires, hypochromes. Le fer étant un constituant majeur de l'hème, toute carence en fer bloque l'érythropoïèse. Dans un premier temps, les réserves en fer sont épuisées, puis l'érythropoïèse est atteinte et une microcytose apparaît.*
*Le traitement doit être double :*
- *supprimer la cause de la carence ;*
- *reconstituer les réserves en fer.*

# I. Étude épidémiologique

La carence en fer est largement répandue dans le monde. Elle touche les personnes de tout âge et toutes les classes sociales. L'étiologie de la sidéropénie est fonction de l'âge et des groupes ethniques.

## A. Chez l'adulte

### 1. Excès de perte par saignement chronique : 90 % des cas

L'alimentation normale dans un pays développé apporte 15 mg de fer par jour ; 10 % de cet apport est réellement absorbé, soit 1,5 mg et cet apport couvre exactement les pertes. Un saignement chronique inaperçu de 10 ml par jour (soit 5 mg de fer) peut entraîner une anémie après épuisement du stock de réserve en fer.
Les points de départ de ces saignements sont le plus souvent digestifs ou génitaux.

#### a) Hémorragies digestives

Chez l'homme et chez la femme ménopausée, les anémies par carence martiale ont le plus souvent pour cause des pertes occultes de sang d'origine digestive, décelées par des examens endoscopiques. Les causes majeures sont représentées par les hernies hiatales, les ulcères gastriques, les cancers du côlon droit, les hémorroïdes et les gastrites médicamenteuses liées à la prise répétée d'anti-inflammatoires ou d'aspirine.
Chez les malades porteurs d'une hernie hiatale, l'anémie est retrouvée dans 8 à 38 % des cas. D'autres causes plus rares peuvent être retrouvées : polypes coliques, diverticuloses coliques, parasites intestinaux comme l'ankylostomiase, rare en Europe et qui entraîne des hémorragies intestinales chroniques.

#### b) Hémorragies génitales chez la femme

De façon physiologique, le flux menstruel est d'environ 40 ml par cycle. Des pertes dépassant 80 ml (environ 30 mg de fer) se produiront chez 10 % des femmes. Si un supplément en fer n'est pas introduit dans l'alimentation, une carence peut s'installer et des études épidémiologiques ont montré que 40 % des femmes en

### 1. Chez le nourrisson

L'anémie hypochrome sidéropénique est toujours fréquente :
- en France, 30 % environ des nourrissons hospitalisés présentent une carence martiale ;
- dans les pays sous-développés, la fréquence est supérieure, associée à des carences complexes.

L'enfant de poids normal à la naissance possède une réserve de fer suffisante aux besoins de l'érythropoïèse jusqu'à l'âge de 4 ou 5 mois. L'apport en fer de l'alimentation lactée est très médiocre et ne couvre pas le besoin quotidien de 6 mg nécessité par la croissance rapide.
Différents facteurs limitant l'apport en fer peuvent rompre cet équilibre précaire :
- régime lacté prolongé au-delà du sixième mois ;
- anorexie rebelle ;
- troubles digestifs chroniques.

Une anémie peut apparaître d'autant plus rapidement que les réserves en fer sont insuffisantes à la naissance. C'est le cas :
- des prématurés de faibles poids à la naissance ;
- des jumeaux où, dès le deuxième ou le troisième mois, les nourrissons sont en état de carence martiale.

### 2. Après 3 ans

L'anémie par carence martiale devient beaucoup plus rare, la croissance ralentissant et l'alimentation diversifiée couvrant les besoins en fer.

### 3. À l'adolescence

En particulier chez les filles, la croissance redevient rapide. L'apparition des premières menstruations accentue le déséquilibre martial. La chlorose des jeunes filles, décrite autrefois, est une forme extrême de cette carence martiale.

### 4. Dans les pays sous-développés

Une forme particulière des anémies par carence martiale est décrite sous le nom de « pica ». Elle associe un retard staturopondéral (ou pubertaire), une anémie hypochrome hyposidérémique sévère et une anomalie du goût poussant les enfants à absorber de la terre. La terre se comporte comme un chélateur au fer, supprimant son absorption.

## II. Principaux signes cliniques

L'anémie est d'installation progressive et ne représente que le stade ultime de la carence martiale. Chez des malades anémiques depuis plusieurs mois, différents signes cliniques sont retrouvés :

En revanche, lorsque la cause d'une déperdition sanguine n'est pas évidente, il sera nécessaire de réaliser des examens complémentaires de type fibroscopie gastrique ou coloscopie pour rechercher une lésion digestive.

## IV. Bases du traitement

Plusieurs aspects doivent être envisagés :
- le traitement peut être préventif, en particulier chez l'enfant ;
- le traitement doit viser à supprimer la cause ;
- enfin, le traitement doit permettre une reconstitution des réserves en fer de l'organisme.

### A. Traitement préventif

Des mesures préventives peuvent être instituées pour éviter ou diminuer l'importance de la carence en fer.
*Chez la femme enceinte*, au cours des derniers mois de grossesse, une prescription de fer ne sera pas inutile si le régime alimentaire n'est pas suffisamment équilibré.
*Chez le nourrisson*, l'allaitement maternel doit être conseillé ou l'utilisation de laits maternisés enrichis en fer. À partir du cinquième mois, une diversification de l'alimentation avec l'introduction de légumes verts, puis de la viande, permettra d'éviter une carence martiale.
Enfin, chez les enfants présentant des risques de carence martiale (jumeaux, prématurés, pathologie digestive), il est recommandé de surveiller l'hémogramme afin d'instituer un traitement martial dès la constatation d'une légère anomalie.

### B. Traitement de la cause

Dans tous les cas possibles, il est nécessaire de supprimer la cause d'un saignement : traitement d'hémorroïdes, correction de ménorragies, etc.

### C. Traitement curatif

Le traitement curatif est représenté par la médication martiale. Le fer est administré par voie orale, sous forme de sels ferreux : gluconate, fumarate, glutamate ou aspartate ferreux, mieux absorbés que les sels ferriques. La posologie est de 100 à 200 mg de fer par jour et sera fonction de la teneur en fer de la préparation officinale choisie.
Les prises doivent être fractionnées. L'administration au cours du repas favorise la tolérance, mais diminue l'absorption – une prise préprandiale est recommandée.
Le traitement entraîne une coloration noirâtre des selles dont il faudra avertir le malade. La tolérance digestive peut être médiocre (diarrhée, vomissements, gastralgies), mais ne nécessite pas la suspension du traitement.

Chez l'enfant, la posologie quotidienne est calculée sur la base de 6 à 10 mg de fer métal par kg. Le sulfate ferreux ne sera pas prescrit en raison du risque d'intoxication. L'utilisation du fer par voie parentérale est réservée à des cas exceptionnels d'intolérances gastro-intestinales, en raison des dangers des injections intramusculaires ou intraveineuses (chocs anaphylactiques).

**Tableau 1.** Liste des principaux traitements contenant du fer

| Spécialité | Sels | Contenu en fer |
|---|---|---|
| Ascofer® | Ascorbate | 33 mg/comprimé |
| Fumafer® | Fumarate | 66 mg/comprimé |
| Tardyféron® | Sulfate | 80 mg/comprimé |
| Inofer® | Succinate | 33 mg/comprimé |

### D. Transfusions sanguines

Les indications sont rares dans le traitement des anémies par carence martiale. Elles seront réservées aux cas d'anémie extrême ou de défaillance cardiovasculaire. Il sera préférable de transfuser des hématies déplasmatisées.

## V. Évolution

Sous l'influence du traitement martial, une crise réticulocytaire apparaît entre le septième et le douzième jour, suivie d'une remontée globulaire et d'une correction des constantes érythrocytaires au bout de trois mois environ. Le traitement sera poursuivi pendant un an pour reconstituer les réserves en fer. Si la cause n'est pas supprimée, le traitement sera poursuivi indéfiniment.

## L'essentiel de la question

Les anémies par carence martiale sont facilement identifiables par des examens biologiques simples de bonne qualité. Chez l'enfant, elles peuvent être responsables d'hypotrophie. Chez l'adulte, les causes le plus souvent retrouvées sont représentées par des hémorragies occultes pouvant être révélatrices d'une néoplasie digestive. Un traitement causal et martial bien conduit permet une guérison de l'anémie en quelques semaines.

# Les anémies hémolytiques

A. STEPANIAN, Service d'hématologie biologique et transfusion, CHU Louis Mourier (AP-HP), Colombes.
V. SIGURET
Service d'hématologie biologique, Groupe hospitalier Charles Foix – Jean Rostand (AP-HP), Ivry-sur-Seine,
Hématologie, faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques, Université Paris-V.
P. GAUSSEM
Service d'hématologie biologique A, Hôpital européen Georges Pompidou (AP-HP), Paris.
Hématologie, faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques, Université Paris-V.

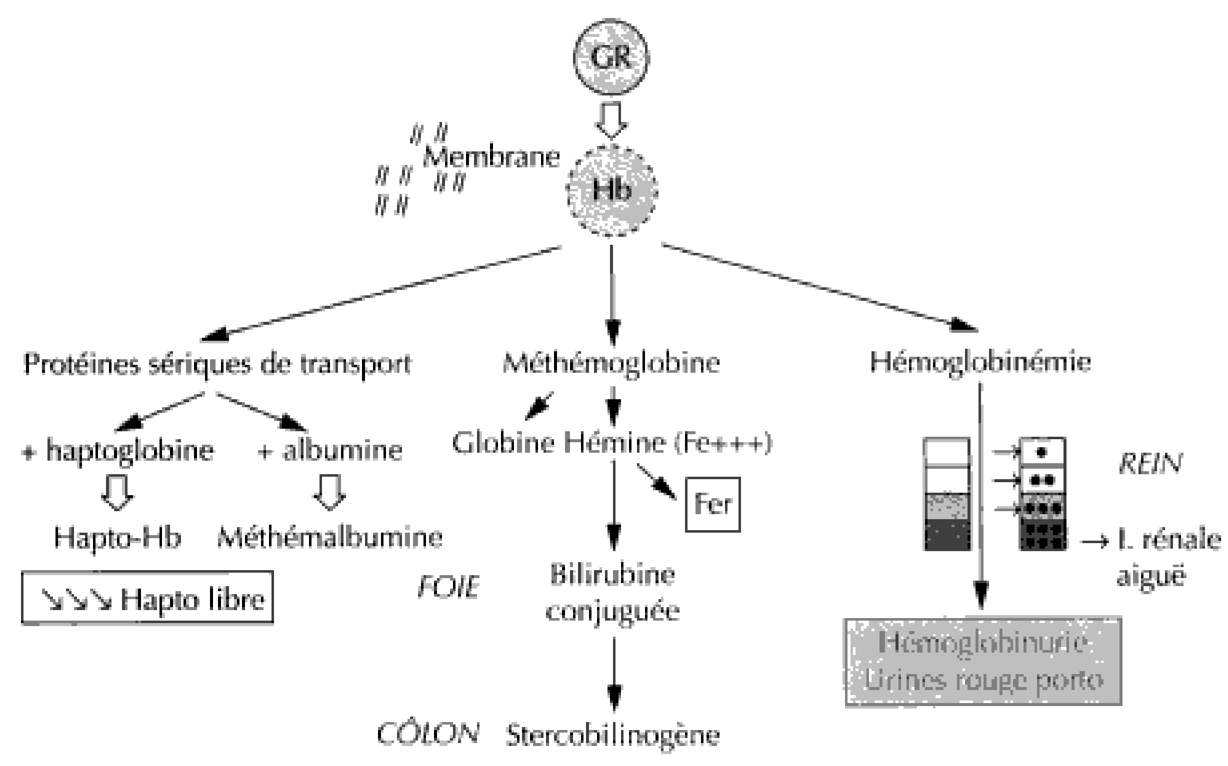


Figure 3. Hémolyse intravasculaire

## C. Recherche d'auto- ou d'allo-anticorps dirigés contre les hématies : tests de Coombs

Ces examens comptent parmi les premiers examens d'orientation diagnostique (cf. *infra*) :

- le *test direct à l'antiglobuline* (TDA, également appelé « test de Coombs direct ») permet de mettre en évidence des anticorps fixés sur les hématies du patient, quelle que soit leur nature. Les auto-anticorps sont mis en évidence par cette technique. Si le TDA est positif, différentes techniques existent, qui permettent l'*élution* de ces anticorps (détachement des hématies) afin d'étudier leur isotype (IgG, IgM, ± complément), en fonction de leur spécificité (antirhésus, anti-Ii, anti-P, etc.) et de leurs propriétés hémolysantes (optimum thermique d'activité : anticorps chauds, froids ou biphasiques) ;
- les allo-anticorps à l'origine d'une hémolyse peuvent être mis en évidence par le *test indirect à l'antiglobuline* (TIA, également appelé « test de Coombs indirect »). Dans le TIA, les anticorps sériques du patient sont mis en évidence par des techniques d'agglutination d'hématies de phénotype connu dans différentes conditions (tampons, température, etc.). L'utilisation d'un panel d'hématies différentes permet de déterminer la spécificité de l'anticorps.

## D. Autres tests

D'autres examens spécifiques, plus ou moins spécialisés, seront mis en œuvre en fonction du contexte clinique de l'anémie hémolytique (cf. *infra*) : étude de l'hémoglobine, tests de résistance globulaire, dosage d'enzymes intraérythrocytaires, etc.

### E. Mesure de la durée de vie *in vivo* des hématies marquées au chrome[51]

Cet examen n'est mis en œuvre que dans de rares cas pour confirmer une hyperhémolyse, en préciser le siège, notamment l'importance de la séquestration splénique lorsqu'une splénectomie est envisagée. Les hématies du sujet (ou des hématies autologues pour mettre en évidence une hémolyse extracorpusculaire) sont marquées *in vitro* au $^{51}Cr$ puis réinjectées au patient. Le temps de demi-disparition de la radioactivité initiale au cours du temps est mesuré. Chez le sujet normal, la demi-vie des hématies est comprise entre 24 et 32 jours. En cas d'anomalie corpusculaire, la demi-vie des hématies du patient est diminuée, alors que les hématies d'un sujet sain injectées au malade ont une demi-vie normale (et inversement en cas d'anomalie extracorpusculaire). Le siège de la destruction est précisé par des comptages externes. Cette épreuve peut être complétée par une étude cinétique au $^{59}Fer$.

## V. Anémies par hémolyse extracorpusculaire

### A. Hémolyses mécaniques

Les membranes des hématies subissent une rupture après un choc sur un obstacle. On trouve alors souvent des *schizocytes* sur le frottis, des débris érythrocytaires ou des microsphérocytes :
- valves ou prothèses cardiaques ;
- circulation extracorporelle ;
- choc contre des thrombi dans la circulation :
  - coagulation intravasculaire disséminée,
  - microangiopathies thrombotiques comme le purpura thrombotique thrombocytopénique de l'adulte (ou syndrome de Moschowitz), le syndrome hémolytique et urémique de l'enfant. Il existe dans ces cas une lésion endothéliale à l'origine de la pathologie.

### B. Hémolyses toxiques

- Métaux lourds : arsenic, cuivre, plomb, etc.
- Autres : venins de serpents, alcool, champignons, eau distillée IV, $O_2$ hyperbare, etc.

### C. Hémolyses médicamenteuses

Il existe plusieurs mécanismes, soit par destruction directe, soit par un processus immuno-allergique (cf. *infra*). Les principaux médicaments en cause sont : l'Aldomet®, les anti-inflammatoires, la pénicilline, la rifampicine, les sulfamides, les antimitotiques, les antipaludéens de synthèse, etc.

### b) Étiologies

Selon l'âge du patient, le type d'anticorps et le contexte clinique, il faut rechercher :

- une maladie auto-immune systémique (lupus, polyarthrite rhumatoïde, syndrome de Sjörgen, etc.) ;
- un syndrome lymphoprolifératif ;
- une infection à mycoplasmes, CMV, EBV, HCV ;
- une cause iatrogène.

## 2. Maladie hémolytique du nouveau-né (MHNN)

La MHNN résulte d'une incompatibilité entre des anticorps maternels dirigés contre des antigènes érythrocytaires du fœtus que ne possède pas la mère : cela nécessite une immunisation préalable de la mère, obtenue par exemple lors d'une grossesse antérieure. Ces anticorps traversent la barrière placentaire (ce sont des IgG), induisent une hémolyse des hématies fœtales et peuvent mettre en jeu le pronostic vital. La gravité de la maladie dépend du titre des anticorps. Dans les cas les plus graves, il s'agit d'un *anti-D* (presque 90 % des cas).
La gravité de la maladie impose une recherche systématique de ces agglutinines (anticorps) chez toutes les femmes enceintes ayant un rhésus négatif (D–) au moins en début et en fin de grossesse (RAI). En cas de positivité, la spécificité de l'anticorps est déterminée et son *dosage* est effectué (dosage pondéral et titrage). En fonction du type d'anticorps, de son titre et de l'âge gestationnel, l'attitude thérapeutique va de la simple surveillance (RAI répétées) à l'échange transfusionnel chez le nouveau-né, voire à la transfusion globulaire *in utero* chez le fœtus.
Pour prévenir la MHNN, les femmes enceintes de rhésus négatif peuvent être menées à recevoir des injections d'*immunoglobulines anti-D* en vue de détruire les hématies D+ du fœtus (qui sont éventuellement passées dans la circulation maternelle) et d'éviter ainsi une immunisation chez elles.

## 3. Incompatibilité transfusionnelle

Si un patient reçoit des hématies pourvues d'un antigène contre lequel il possède un anticorps (transfusion incompatible), il en résulte une hémolyse aiguë intravasculaire mettant en jeu le pronostic vital (insuffisance rénale, défaillances, coma, etc.). Avant toute transfusion, il est donc obligatoire de rechercher un anticorps irrégulier = RAI, c'est-à-dire immun, afin de choisir un produit adapté.

# VI. Anémies par hémolyse corpusculaire

Les anémies hémolytiques d'origine corpusculaire sont des anémies périphériques régénératives dues à des anomalies intrinsèques des hématies. Elles sont le plus souvent constitutionnelles.

## A. Anomalies de l'hémoglobine

(Voir « *Hémoglobinopathies : drépanocytose et thalassémies* »)
Les hémoglobinopathies constituent l'étiologie *la plus fréquente des anémies hémolytiques corpusculaires*. Elles peuvent être schématiquement divisées en deux groupes : celles qui résultent d'anomalies de structure, comme la drépanocytose homozygote, et celles qui résultent d'anomalies de synthèse des chaînes – déficits quantitatifs –, comme les thalassémies majeures. Le diagnostic nécessite dans tous les cas une étude de l'hémoglobine.

## B. Anomalies membranaires

### 1. Pathologies congénitales

#### a) Sphérocytose héréditaire : maladie de Minkowski-Chauffard

C'est la pathologie de la membrane érythrocytaire constitutionnelle la plus fréquente. Cette pathologie est plus répandue chez le sujet indo-européen.

■ *Génétique*

Le mode de transmission est le plus souvent autosomique dominant, mais parfois récessif.

■ *Physiopathologie*

Un grand nombre de mutations sont décrites, affectant différentes protéines impliquées dans le maintien de la structure membranaire de l'hématie : ankyrine, bande 3, protéine 4.2 ou spectrine. Ces anomalies de l'architecture du cytosquelette qui sous-tend la membrane aboutissent à la formation de microvésiculations. Ces pertes de « substance membranaire » diminuent la déformabilité de l'hématie qui devient donc plus sphérique (« sphérocyte »), plus rigide et donc plus facilement dégradable.

■ *Clinique*

Ictère, anémie, splénomégalie, lithiase biliaire. La sévérité de la maladie est très hétérogène, allant de l'ictère néonatal nécessitant une exsanguino-transfusion à des formes de très bonne tolérance avec une anémie hémolytique chronique parfaitement compensée. Le diagnostic peut alors être fait en cas de décompensation à l'occasion d'une infection, grossesse, etc.

■ *Diagnostic biologique*

Il repose sur :
- la recherche de sphérocytes sur le frottis ;
- l'étude des paramètres érythrocytaires et réticulocytaires (automates intégrant l'analyse par cytométrie en flux des hématies) ;
- des examens étudiant la fragilité globulaire selon différentes techniques :
  - ektacytométrie : c'est le test le plus précis. Il permet de quantifier la déformabilité des hématies dans un gradient osmotique (*fig. 4*),

– étude de la résistance globulaire aux solutions hypotoniques (solutions de concentrations décroissantes de NaCl) : la résistance est diminuée par rapport à un témoin dans la sphérocytose héréditaire,
– autohémolyse spontanée *in vitro* à 37 °C qui est augmentée, corrigée par le glucose,
– il est également possible d'effectuer une étude isotopique des hématies marquées.

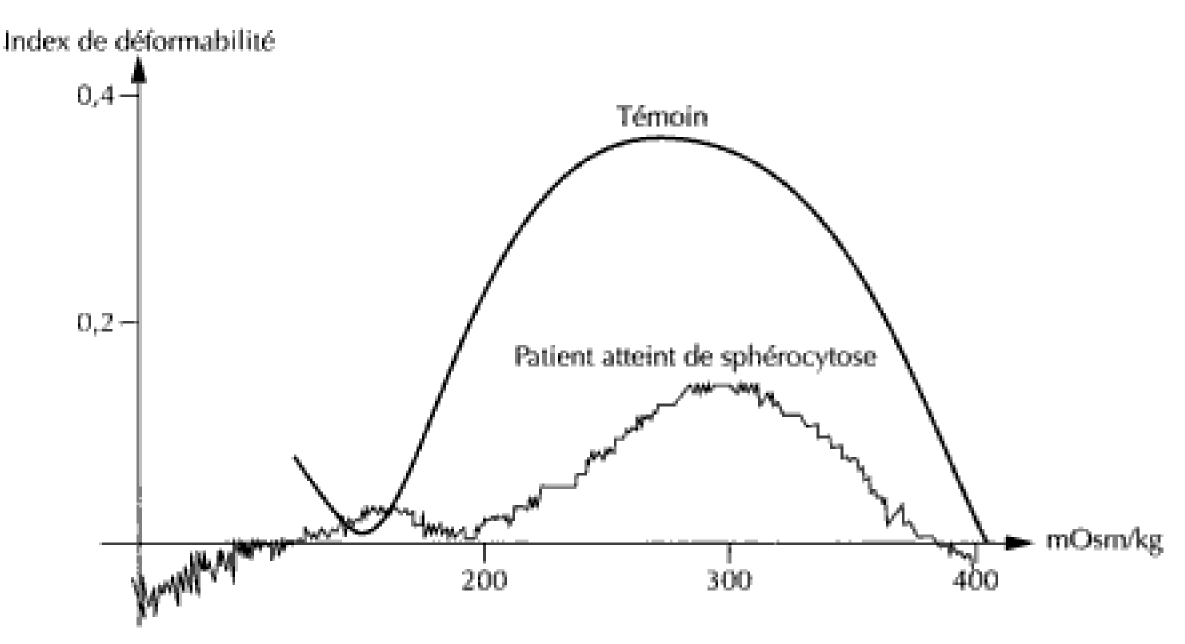



**Figure 4.** Ektacytométrie : courbe de déformabilité des globules rouges en gradient osmolaire

### ■ *Traitement*

Les transfusions sont rares. Dans les formes sévères, une splénectomie peut être proposée : elle est possible après l'âge de 5 ans et nécessite des vaccinations antipneumococcique, antiméningococcique et anti-*Haemophilus influenzae*, ainsi qu'une antibiothérapie prophylactique au long cours (Oracilline®).

### b) Autres anomalies membranaires congénitales

Elles sont plus rares et leur diagnostic nécessite l'examen du frottis sanguin et l'étude biochimique des protéines de la membrane :

- elliptocytose (anomalies de tétramérisation de la spectrine) : hématies ovoïdes > 15 % ;
- pyropoïkilocytose (hématies déchiquetées) : homozygotie ou hétérozygotie composite d'anomalies génétiques responsables d'elliptocytose ;
- acanthocytose : hématies en forme d'oursin ;
- stomatocytose : hématies en forme de bouche.

## 2. Pathologie acquise : hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) ou maladie de Marchiafava-Micheli

### a) Caractéristiques

C'est une maladie rare qui touche en général le sujet jeune (de 20 à 40 ans). Il s'agit d'une anomalie acquise de la membrane des cellules souches myéloïdes, qui peut

• le métabolisme des acides nucléiques.

Les déficits des différentes enzymes impliquées dans ces voies métaboliques peuvent donc causer la mort prématurée de la cellule. Parmi les déficits responsables d'anémie hémolytiques, deux se distinguent par leur fréquence : le déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) et le déficit en pyruvate kinase.

## 1. Déficit en G6PD

La G6PD est une enzyme importante de la voie des pentoses phosphates. C'est l'enzymopathie érythrocytaire la plus répandue. Certaines ethnies sont plus affectées (ethnies noires, bassin méditerranéen essentiellement).

### a) Génétique

Le mode de transmission est récessif, lié au sexe : seuls les garçons sont atteints. Les femmes qui transmettent l'affection sont dites « conductrices ».

### b) Physiopathologie

Ce déficit entraîne un défaut de régénération du NADPH et par conséquent, de celle du glutathion réduit. Ce dernier a pour fonction la détoxication des peroxydes. Les protéines de l'hématie sont ainsi oxydées et précipitent en formant des *corps de Heinz*. La membrane de l'hématie perd sa déformabilité et la cellule est rapidement éliminée.

Il existe plus de 400 mutations du gène de la G6PD, qui entraînent une activité de l'enzyme plus ou moins diminuée. Cela explique l'*hétérogénéité clinique* de l'affection. En général, le déficit seul ne suffit pas pour provoquer l'hémolyse. Celle-ci est plutôt *déclenchée par un facteur extérieur* (nombreux médicaments, certaines infections, fèves, pois, artichaut, etc.).

### c) Phénotype

Parmi les variants déficients, le déficit de type Gd(–)A est observé chez le sujet originaire d'Afrique noire : l'activité de l'enzyme est souvent comprise entre 10 et 20 %. En revanche, le type Gd(–)B est plutôt fréquent dans le bassin méditerranéen et l'enzyme possède alors une activité comprise entre 2 et 15 %.

### d) Clinique

L'interrogatoire doit prendre en compte l'origine ethnique, le sexe et la notion de facteur déclenchant. L'hémolyse possède le plus souvent un caractère aigu : elle a lieu entre un et trois jours après le facteur déclenchant. Les hémolyses chroniques sont beaucoup plus rares et associées à certains types. Chez le nouveau-né atteint, un ictère prolongé est fréquent.

### e) Diagnostic biologique

- Anémie normocytaire, normochrome, très régénérative avec réticulocytose élevée.
- Signes biologiques d'hémolyse (cf. *supra*).
- Observation sur le frottis d'hématies fantômes et de corps de Heinz (coloration au bleu de crésyl).
- Le *dosage de l'activité enzymatique de la G6PD érythrocytaire* par spectrophotométrie en UV permet d'établir le diagnostic.

#### f) Conduite à tenir

Proscrire la consommation d'aliments ou la prise de médicaments susceptibles de déclencher l'hémolyse.

### 2. Déficit en pyruvate kinase

La PK est une enzyme de la voie de la glycolyse anaérobie. Elle ne touche aucune ethnie plus particulièrement qu'une autre.

#### a) Génétique

Le mode de transmission est autosomique récessif : les deux sexes peuvent donc être atteints. La forme hétérozygote est totalement asymptomatique. Les mutations du gène de l'enzyme sont à l'origine de déficit quantitatif ou d'anomalies qualitatives.

#### b) Physiopathologie

Ce déficit entraîne un défaut de régénération de l'ATP avec pour conséquence un déficit de la pompe à $Na^+$ et une anomalie des lipides de la membrane. Les hématies deviennent alors plus rigides et sont rapidement éliminées. Chez les hétérozygotes, il se produit un phénomène de compensation.

#### c) Clinique

L'hémolyse possède un caractère chronique. Elle peut être découverte à la naissance (ictère néonatal) ou de façon tardive chez l'adulte. Sa gravité présente également une grande hétérogénéité.

#### d) Diagnostic biologique

- Anémie et signes biologiques d'hémolyse variables (cf. *supra*). Il n'y a pas de spécificité morphologique des hématies.
- Le dosage de l'*activité enzymatique* de la PK érythrocytaire par spectrophotométrie en UV permet d'établir le diagnostic : elle est comprise entre 0 et 30 % de la normale.
- L'*autohémolyse in vitro* des hématies après 48 heures à 37 °C est augmentée. Elle est corrigée par l'addition d'ATP mais pas par le glucose.

#### e) Conduite à tenir

Ces patients peuvent nécessiter des transfusions sanguines régulières. Une splénectomie permettrait dans certains cas de les espacer.

## Conclusion

Le diagnostic d'une anémie hémolytique n'est pas toujours aisé, surtout lorsque celle-ci présente un caractère chronique. Une anémie hémolytique peut être associée à une pathologie qu'elle révèle. Le bilan étiologique d'une anémie hémolytique nécessite l'étude du contexte clinique, de déterminer le caractère plutôt congénital

ou acquis de la pathologie, la localisation plutôt intravasculaire ou intratissulaire de l'hémolyse, et le diagnostic conditionnera la prise en charge du patient. Le traitement est souvent symptomatique. Lorsque l'anémie est mal tolérée (signes d'hypoxie cérébrale ou d'angor fonctionnel), l'indication d'une transfusion peut être discutée.

## L'essentiel de la question

L'hémolyse est définie par la destruction des hématies par rupture ou lésion de la membrane entraînant la libération de leur contenu dans la circulation. L'hémolyse pathologique s'accompagne de signes de destruction globulaire exagérée et de régénération. Si l'hyperhémolyse n'est pas compensée, elle peut conduire à une anémie dite « hémolytique ».

Les anémies hémolytiques peuvent avoir une cause extracorpusculaire (la rupture de la membrane est causée par un élément extérieur) ou corpusculaire (c'est une anomalie d'un des constituants de l'hématie qui est à l'origine de l'hémolyse). Les anémies hémolytiques extracorpusculaires peuvent avoir une cause mécanique (valves cardiaques, etc.), toxique, médicamenteuse, infectieuse (paludisme, etc.) ou immunologique (anémie hémolytique auto-immune, maladie hémolytique du nouveau-né, incompatibilité transfusionnelle). Les anémies hémolytiques corpusculaires sont principalement dues à des anomalies de l'hémoglobine (syndromes drépanocytaires, thalassémies), de la membrane érythrocytaire (sphérocytose congénitale, hémoglobinurie paroxystique nocturne, etc.) ou des enzymes érythrocytaires (déficits en G6PD, en pyruvate kinase, etc.).

***Pour en savoir plus***

- Sébahoun G. *Hématologie clinique et biologique*, 2[e] éd., Paris, Arnette, 2005, 1-578.
- Référentiels. Société française d'hématologie, édition novembre 2006.

# Les anémies macrocytaires

V. SIGURET
Service d'hématologie biologique, Groupe hospitalier Charles Foix – Jean Rostand (AP-HP), Ivry-sur-Seine.
Hématologie, faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques, Université Paris-V.
A. STEPANIAN, Service d'hématologie biologique et transfusion, CHU Louis Mourier (AP-HP), Colombes.
P. GAUSSEM
Service d'hématologie biologique A, Hôpital européen Georges Pompidou (AP-HP), Paris.
Hématologie, faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques, Université Paris-V.

# I. Définitions

Une anémie macrocytaire est définie par une diminution du taux d'hémoglobine (Hb), inférieur à 130 g/L chez l'homme et à 120 g/L chez la femme, accompagnée d'une augmentation du volume globulaire moyen (VGM) supérieur à 100 fL. Les anémies macrocytaires simples, pour lesquelles le VGM est habituellement compris entre 100 et 105 fL et dont les étiologies sont variées, sont habituellement distinguées des anémies dites « mégalocytaires » pour lesquelles le VGM est supérieur à 105 fL et qui sont le plus souvent dues à une carence en folates et/ou en vitamine $B_{12}$. Chez le nouveau-né, dont le taux de Hb à la naissance est compris entre 140 et 210 g/L, il existe une macrocytose physiologique (VGM compris entre 105 et 125 fL) qui tend progressivement à la normocytose après le premier mois.

# II. Conduite diagnostique devant une anémie macrocytaire et mécanismes impliqués

La *figure 1* résume la conduite à tenir devant la découverte d'une anémie macrocytaire.

## A. Éliminer une fausse macrocytose due à la présence d'agglutinines froides

Les agglutinines froides sont des anticorps (en général des IgM) actives à température ambiante, et qui ont la propriété d'agglutiner les hématies à ladite température, d'où une fausse macrocytose observée lors du passage de la numération sur les automates de cytologie. L'incubation préalable du sang à 37 °C permet de « désagglutiner » les hématies et d'éliminer l'interférence.

## B. Numération des réticulocytes

C'est la première étape de la conduite diagnostique. Elle permet de distinguer les anémies macrocytaires régénératives (réticulocytes > 120 giga/L) des anémies macrocytaires non régénératives (réticulocytes < 120 giga/L).

### 1. Anémies macrocytaires régénératives

La réticulocytose est supérieure à 120 giga/L, le plus souvent supérieure à 150 giga/L, voire beaucoup plus. Elle témoigne d'une régénération intense liée à une érythropoïèse médullaire très stimulée, parfois même accélérée. Les réticulocytes et les hématies récemment produites par la moelle ayant un volume supérieur à celui d'hématies circulant depuis plusieurs semaines, le VGM de l'ensemble

des hématies pendant la période de régénération intense s'en trouve majoré. Cette situation peut se rencontrer lors de régénération secondaire à une anémie par hémorragie aiguë massive : il n'y a alors aucun signe d'hémolyse (*fig. 1*). Cette situation se rencontre également lors de régénération secondaire à une hémolyse aiguë : des signes d'hémolyse sont alors présents avec une augmentation de la bilirubine libre sérique et une haptoglobine plasmatique effondrée.

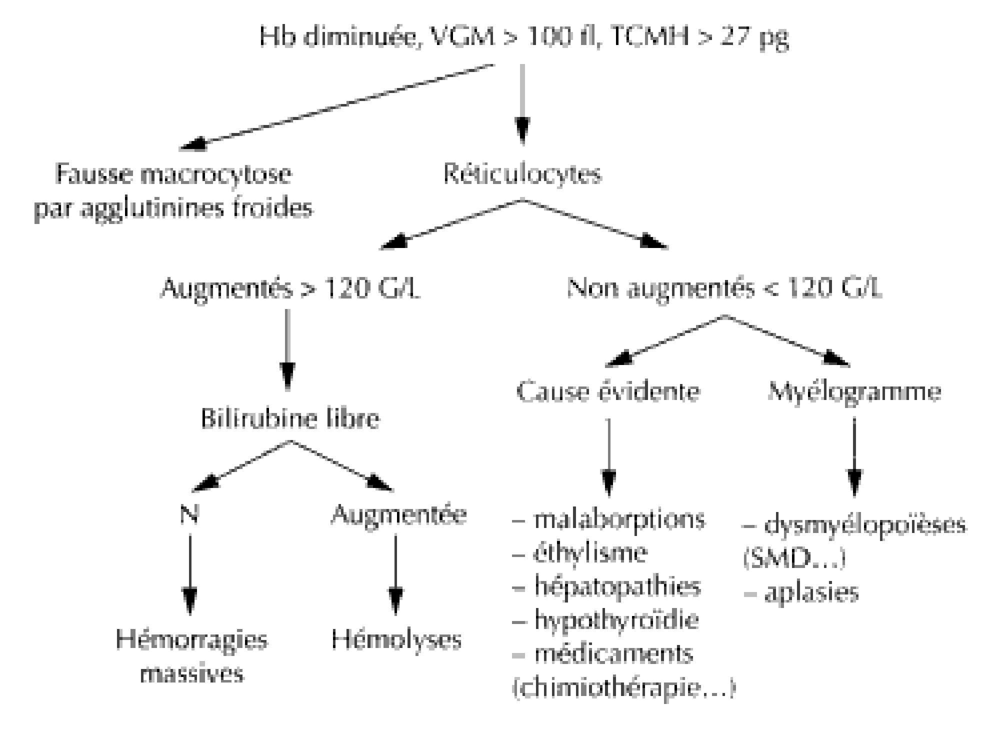
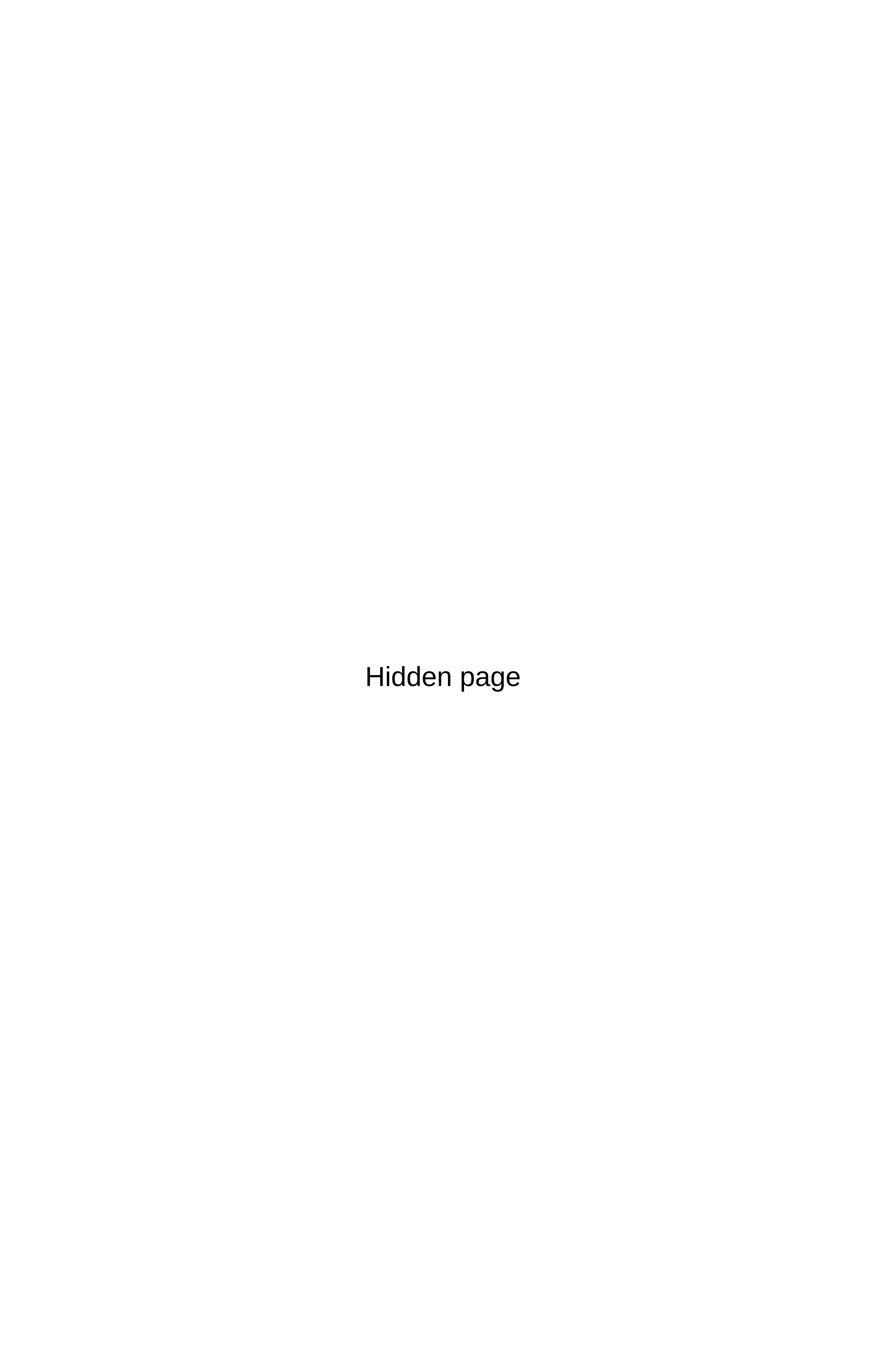



**Figure 1.** Conduite diagnostique d'une anémie macrocytaire

## 2. Anémies macrocytaires non régénératives (réticulocytes < 120 giga/L)

Dans ce cas, la macrocytose témoigne d'une dysérythropoïèse médullaire : au niveau des précurseurs érythroblastiques médullaires, il existe un retard de maturation du noyau lié à des anomalies de synthèse de l'ADN, tandis que la maturation du cytoplasme se fait plus rapidement, se traduisant ainsi par des asynchronismes de maturation nucléocytoplasmique. Il en résulte un avortement intramédullaire anormal des précurseurs érythroïdes, qui s'accompagne de signes d'hémolyse intratissulaire. La synthèse de l'ADN met notamment en jeu vitamine $B_{12}$ et folates (*fig. 2*).

Dans la démarche diagnostique, il convient d'identifier un certain nombre de situations cliniques où une anémie macrocytaire est classiquement observée et pour lesquelles une exploration plus approfondie n'est pas forcément nécessaire. Dans le cas contraire, le dosage sérique de la vitamine $B_{12}$ ainsi que celui des folates, ou de préférence le dosage des folates intraérythrocytaires, permettent de progresser dans la démarche diagnostique. Si ces dosages s'avèrent normaux, un myélogramme est indispensable.


Hidden page

- Une thrombopénie et/ou une leucopénie (neutropénie et parfois même lymphopénie) accompagnent souvent l'anémie d'où une bicytopénie, voire une pancytopénie.
- Observation du frottis sanguin : mégalocytose, anisopoïkilocytose, polychromasie, corps de Howell-Jolly, microsphérocytes et schizocytes (liés à l'hémolyse), présence de polynucléaires neutrophiles avec des noyaux hypersegmentés (> 5 lobes), ce qui est très évocateur.

#### ■ *Bilan biochimique*

- Signes d'hémolyse : augmentation de la bilirubine libre, diminution de l'haptoglobine, augmentation très importante des LDH.
- Fer sérique normal.
- Vitamine $B_{12}$ sérique diminuée, voire effondrée (valeurs usuelles variables selon les techniques).

*Remarque* : le test de Schilling, réalisé à l'aide de vitamine $B_{12}$ radiomarquée (± facteur intrinsèque) n'est plus pratiqué actuellement en routine et n'est fait qu'en cas de difficultés diagnostiques.

- Hyperhomocystéinémie.

#### ■ *Bilan d'auto-immunité*

- Recherche d'anticorps anticellules pariétales de l'estomac, dirigés spécifiquement contre la pompe à protons ATPase $H^+$-$K^+$.
- Recherche d'anticorps antifacteur intrinsèque de nature bloquants (empêchent la formation du complexe $B_{12}$-FI) ou précipitants (inhibant la fixation du complexe sur le récepteur intestinal).
- Recherche d'autres auto-anticorps (antithyroïde, antinucléaires, etc.).

#### ■ *Myélogramme*

Il n'est plus pratiqué qu'en cas de difficultés diagnostiques et est caractérisé par :

- une moelle riche avec une hyperplasie franche de la lignée érythroblastique (> 35 %), dont un fort pourcentage de proérythroblastes et d'érythroblastes basophiles, donnant à la moelle un aspect caractéristique « bleu outremer » ;
- des asynchronismes de maturation nucléocytoplasmique et un gigantisme cellulaire touchant l'ensemble des lignées : la lignée érythroblastique présente des mégaloblastes avec des signes de dysérythropoïèse très marqués parmi lesquels un aspect « perlé » de la chromatine. Au niveau de la lignée granuleuse, il y a des métamyélocytes géants et des polynucléaires hypersegmentés. Les mégacaryocytes sont hyperlobés.

#### ■ *Exploration complémentaire*

La fibroscopie gastrique avec biopsie permet de mettre en évidence une atrophie de la muqueuse fundique et une achlorhydrie par pH-métrie gastrique.

## 4. Traitement

Quelle que soit la cause de la carence en vitamine $B_{12}$.

# I. Généralités

- Syndrome myéloprolifératif touchant principalement la lignée érythroblastique et caractérisé par une augmentation de la masse érythrocytaire.
- Maladie clonale d'évolution souvent progressive.
- Évolution possible vers d'autres syndromes myéloprolifératifs en particulier vers la splénomégalie myéloïde chronique.
- Pose le problème du diagnostic différentiel des polyglobulies secondaires et réactionnelles.

# II. Épidémiologie

Hémopathie peu fréquente :
- incidence par an voisine de 5 à 15 cas par millions d'habitants ;
- différences ethniques :
  - rare au Japon,
  - plus fréquente chez certains groupes de population, comme les juifs ashkénazes.
- Maladie de l'adulte : âge moyen du diagnostic : 60 ans ; extrêmement rare avant 30 ans.

# III. Signes cliniques

Les principales manifestations cliniques de la maladie de Vaquez sont les conséquences directes de la prolifération des différentes lignées. Les signes cliniques révélateurs sont multiples :
- érythrose faciale et des extrémités (80 à 85 %) ;
- altération de l'état général, amaigrissement ;
- signes d'hyperviscosité sanguine :
  - céphalées, vertiges, acouphènes, paresthésies,
  - hypertension artérielle,
  - accidents vasculaires par thrombose artérielle ou veineuse :
    - thromboses des membres inférieurs, embolies pulmonaires, accidents vasculaires cérébraux,
    - sites inhabituels : thromboses spléniques, hépatiques et mésentériques,
    - cas particulier du syndrome de Budd-Chiari (thrombose des veines sus-hépatiques et/ou de la veine cave inférieure) ;
- érythromélalgies ;
- épigastralgies ;
- prurit à l'eau chaude (évocateur mais non spécifique) ;
- splénomégalie (70 %), signe essentiel du diagnostic.

### G. Autres paramètres

- Normalité des paramètres de la gazométrie sanguine ($pO_2$, $SaO_2$) (critère A2).
- Hyperuricémie.
- Hypervitaminémie B12.
- Parfois hyposidérémie (constant lors d'un traitement par saignées).
- Anomalies fréquentes des fonctions plaquettaires (allongement du temps de saignement, anomalies des tests d'agrégation plaquettaire).

## VI. Diagnostic différentiel

### A. Polyglobulies par hémoconcentration ou fausses polyglobulies

- Hémoconcentrations des états de déshydratation facilement reconnaissables.
- Augmentation de la masse érythrocytaire et diminution du volume plasmatique aux épreuves isotopiques.
- Grands brûlés, surdosage des diurétiques, etc.

### B. Pseudo-polyglobulies microcytaires

- Polyglobulies sans élévation du taux d'hémoglobine, voire associées à une anémie discrète.
- Tableau hématologique typique des syndromes thalassémiques hétérozygotes.
- Le diagnostic repose sur l'électrophorèse de l'hémoglobine (Hb) et le dosage de l'HbA2.
- Faux problème de diagnostic différentiel, sauf avec les polyglobulies essentielles associées à une carence martiale.

### C. Polyglobulies secondaires compensatrices

- Augmentation de la masse globulaire par élévation du taux d'érythropoïétine en réponse à des conditions diverses mais chroniques d'hypoxie.
- En dehors de la polyglobulie, l'hémogramme est normal.
- Absence de splénomégalie.
- Baisse de la $pO_2$ et/ou de la $SaO_2$ artérielle :
  - polyglobulie d'altitude chez les populations vivant à haute altitude (hauts plateaux andins ou himalayens) ;
  - hypoventilations alvéolaires chroniques :
    - bronchopneumopathies chroniques obstructives,
    - emphysèmes primitifs,
    - pneumoconioses et fibroses pulmonaires,
    - malformations thoraciques des gibbeux (grandes cyphoscolioses),
    - hypoventilation de cause centrale avec ou sans obésité ;

- leucémie aiguë :
  - 10 à 15 % des patients,
  - tardive : 8 à 10 ans,
  - rôle favorisant du radiophosphore et des agents alkylants,
  - tableau biologique et pronostic comparable aux leucémies aiguës (LA) induites.

## L'essentiel de la question

La maladie de Vaquez ou polyglobulie essentielle appartient au groupe des syndromes myéloprolifératifs. Hémopathie clonale, elle est caractérisée par un excès de prolifération des lignées myéloïdes touchant particulièrement la lignée érythroblastique. Contrairement aux polyglobulies secondaires où les concentrations plasmatiques en érythropoïétine (EPO) sont élevées, les progéniteurs érythroblastiques ont acquis une capacité de différenciation et de prolifération indépendante de l'érythropoïétine.
Pour faciliter le diagnostic de maladie de Vaquez, l'OMS a édicté des critères cliniques et biologiques, reposant notamment sur le taux d'Hb, la mesure de la masse sanguine, l'existence ou non d'une splénomégalie, la présence ou non d'une anomalie génétique clonale (mutation V617F de Jak2), la formation spontanée de colonies érythroïdes en culture *in vitro*, la mesure de l'EPO sérique et de la saturation artérielle en $O_2$. Une polyglobulie secondaire doit être exclue.
Les schémas thérapeutiques fondés sur l'administration d'hydroxyurée ou du pipobroman, relativement peu aplasiant, permettent de contrôler la surproduction myéloïde chez la majorité des patients. Néanmoins, près de la moitié des sujets ayant une survie prolongée développent une myélofibrose secondaire, alors que la transformation leucémique est beaucoup moins fréquente.

***Pour en savoir plus***


- Pargade V, Darnige L, Gaussem L. Mutation acquise de la tyrosine kinase Jak2 et maladie de Vaquez. Ann Biol Clin 2006 ; 64 (1) : 3-9.
- Sébahoun G. Maladie de Vaquez, in Hématologie clinique et biologique, G. Sébahoun, ed. Arnette, 2005, 229-233.

# IV. Diagnostic biologique

## A. Hémogramme

L'anémie est rare, de même que la thrombopénie. L'hyperleucocytose est constante, mais d'intensité variable, entre 30 et $50 \times 10^9$/l. Elle est constituée par une lymphocytose composée de lymphocytes morphologiquement normaux. Cette lymphocytose, si elle est persistante, est un des éléments du diagnostic. Un petit pourcentage (moins de 10 %) des cellules de grande taille, nucléolées de type prolymphocytaire ou quelques lymphocytes à noyau incisé, peut être observé. Le frottis comporte des ombres de Gumprecht correspondant à des noyaux écrasés traduisant une certaine fragilité chromatinienne.

## B. Immunophénotype

L'immunophénotype est indispensable au diagnostic de la leucémie lymphoïde chronique. Les cellules de la LLC expriment des molécules propres à la lignée lymphoïde B : HLA-2, CD19, CD20. Le caractère monoclonal se traduit par l'expression d'une seule chaîne lourde le plus souvent à immunoglobulines M et d'une seule chaîne légère des immunoglobulines le plus souvent kappa. Le nombre des sites membranaires des immunoglobulines est très diminué par rapport à des lymphocytes normaux ou à d'autres proliférations lymphoïdes malignes. L'expression de CD5 est caractéristique. Il faut noter que cette molécule est aussi exprimée dans les lymphomes ganglionnaires à cellules de la zone du manteau et dans des leucémies à prolymphocytes. L'expression de CD23 marqueur d'activation (correspondant à un récepteur de faible affinité des IgE) est constante. Inversement, d'autres molécules ne sont pas exprimées : CD22 et CD79b (CD79b : hétérodimère du récepteur des antigènes des lymphocytes B).

## C. Myélogramme

Les frottis sont riches. Ils montrent une infiltration lymphocytaire entre 30 et 90 % faite de cellules identiques à celles du sang.

## D. Biopsie médullaire

Elle précise le degré d'infiltration lymphoïde et sa topographie, diffuse interstitielle ou nodulaire. Une infiltration d'emblée diffuse et massive est de pronostic péjoratif. Le stroma est normal.

## E. Caryotype

Les anomalies chromosomiques sont retrouvées dans la moitié des cas avec l'étude cytogénétique conventionnelle et, dans 80 %, des cas par technique de fluorescence *in situ* après hybridation (FISH). Ces anomalies ont une valeur pronostique. Il s'agit

des délétions 13q14, 6q21, 11q23 et 17p13. Ces deux dernières délétions sont associées à un pronostic défavorable. La trisomie 12q13 peut aussi être retrouvée.

### F. Ponction et/ou biopsie ganglionnaire

Ces explorations sont inutiles au diagnostic. Elles montreraient des nappes de cellules lymphoïdes matures. Elles sont en revanche indiquées dans le cas d'une augmentation du volume des ganglions et peuvent alors révéler une transformation en lymphome.

### G. Immunoglobulines sériques

Il existe dans 50 % des cas un déficit des immunoglobulines sériques soit global, soit sélectif portant sur les immunoglobulines M, A ou G. Ce déficit est responsable des complications infectieuses. Il peut exister un pic d'immunoglobuline sérique monoclonal identique à l'immunoglobuline retrouvée sur les lymphocytes du clone proliférant.

## V. Évolution et complications

L'évolution est chronique, longtemps asymptomatique, puis apparaissent les complications infectieuses, tumorales et hématologiques. La durée médiane de la maladie est de huit à dix ans.

### A. Complications infectieuses

Elles sont causées par l'hypogammaglobulinémie et le déficit immunitaire cellulaire. Les infections sont bactériennes, souvent pleuropulmonaires. Plus rarement, elles sont virales ou mycosiques.

### B. Insuffisance médullaire

L'insuffisance médullaire est liée au degré d'infiltration lymphoïde. Elle est constante en phase terminale.

### C. Complications auto-immunes

Dans 7 % des cas, on observe une anémie hémolytique à Coombs IgG anti-Rhésus ou IgG avec agglutinines froides.

### D. Association à un cancer

Elle est plus fréquente que dans la population générale. Il s'agit de cancers cutanés, digestifs ou bronchiques.

### E. Transformation hématologique

On peut observer une transformation en leucémie prolymphocytaire. On constate alors l'apparition de cellules lymphoïdes de plus grande taille, à chromatine immature et nucléolée. Parallèlement, l'état clinique se détériore et apparaissent une anémie, une thrombopénie et une hyperlymphocytose.
Le syndrome de Richter correspond à la survenue d'un lymphome ganglionnaire ou viscéral à grandes cellules, de haut grade de malignité.

## VI. Facteurs pronostiques

La classification de Binet est la plus utilisée pour déterminer le pronostic. Elle se fonde sur le stade d'extension clinique corrélé aux données de l'hémogramme.
*Stade A* : hypertrophie limitée à un ou deux territoires lymphoïdes. La médiane de survie est supérieure à dix ans.
*Stade B* : l'hypertrophie de trois territoires lymphoïdes ou plus. La médiane de survie est de sept ans.
*Stade C* : caractérisé par l'apparition d'une anémie < 10 g Hb/100 ml et d'une thrombopénie < $100 \times 10^9$/l associé au syndrome tumoral. La médiane de survie est inférieure à deux ans.
Outre cette classification clinicobiologique, d'autres facteurs pronostics sont proposés : le pourcentage de lymphocytes exprimant le CD38 (marqueur de prolifération), le temps de doublement de la lymphocytose, l'état mutationnel des gènes IgVH.

## VII. Diagnostic différentiel

La leucémie lymphoïde chronique doit être différenciée des lymphocytoses d'origine infectieuse et d'autres hémopathies lymphoïdes. Des lymphocytoses sanguines importantes sont observées dans les infections virales (mononucléose infectieuse, infection à cytomégalovirus, toxoplasmose) et certaines infections bactériennes comme la coqueluche. Les autres hémopathies lymphoïdes sont différenciées par l'analyse morphologique et l'immunophénotype :

- *les lymphomes à petites cellules* : la phase leucémique est constituée par des cellules lymphoïdes polymorphes présentant une anisocaryose et des irrégularités des contours nucléaires à type d'incisures. Ces aspects cytologiques caractérisent les lymphomes folliculaires et les lymphomes à cellules de la zone du manteau. Les lymphomes de la zone du manteau partagent avec la LLC la positivité du CD5. La forte positivité des immunoglobulines membranaires distingue généralement les lymphomes de la LLC ;

# La leucémie myéloïde chronique

L. CAMOIN-JAU, J. SAMPOL
Laboratoire d'hématologie, UFR de pharmacie, Marseille.

*La leucémie myéloïde chronique (LMC) fait partie des syndromes myéloprolifératifs. Elle se caractérise par une prolifération prédominante de la lignée granuleuse et par la présence d'une anomalie cytogénétique spécifique, le chromosome Philadelphie (Ph) ou son équivalent moléculaire, le réarrangement moléculaire bcr/abl. Elle évolue en trois phases : une phase chronique, une phase accélérée et une transformation en leucémie aiguë (transformation aiguë ou TA).*

# I. Étiologie, épidémiologie

Aucune prédisposition génétique n'est identifiée. Les radiations ionisantes et certains toxiques (benzène) ont été mis en cause. La fréquence est d'environ dix cas par million d'individus par an. Elle est moins fréquente que la leucémie aiguë, mais plus fréquente chez l'adulte jeune.

# II. Physiopathologie

La leucémie myéloïde chronique est due à une prolifération clonale maligne d'un précurseur hématopoïétique pluripotent. Le chromosome Ph est en effet présent dans les mitoses des précurseurs des granuleux, des monocytes, des érythroblastes, des mégacaryocytes et aussi des lymphocytes T et B. Les cellules du stroma de la moelle ne comportent pas cette anomalie. L'anomalie cytogénétique est acquise. Elle est le résultat d'un échange de matériel génétique (ou translocation réciproque) entre les chromosomes 9 et 22. Les cellules présentant cette anomalie supplantent progressivement les cellules normales. C'est ce qui définit la nature clonale de la maladie.
Les points de cassure sont situés en 9q34 et 22q11 t(9;22q34q11). La biologie moléculaire a démontré que lors de la translocation, le proto-oncogène abl – homologue du gène murin d'Abelson (rétrovirus transformant de la leucémie murine) –, est transloqué du chromosome 9 sur le chromosome 22. Sur le chromosome 9, le site du point de cassure est variable selon les malades, au niveau d'une des trois zones préférentielles de l'intron 1. Sur le chromosome 22, le point de cassure se produit dans une région courte appelée *« break cluster région »* (bcr) pour la grande majorité des malades.
Le gène chimérique ainsi formé, bcr/abl, est transcrit en une protéine hybride p210, dotée d'une forte activité tyrosine kinase jouant un rôle essentiel, nécessaire à la prolifération et à l'accumulation des cellules granuleuses s'accompagnant du passage de précurseurs granuleux dans le sang circulant. En phase de transformation aiguë, apparaissent d'autres anomalies surajoutées à la translocation standard.

# III. Clinique

La maladie s'installe de façon insidieuse. Les signes menant à sa découverte sont peu caractéristiques : asthénie, amaigrissement ou pesanteur abdominale conduisant à la découverte d'une splénomégalie. Parfois, la découverte est faite à l'occasion

d'un examen systématique clinique ou hématologique et rarement à l'occasion d'une complication : thrombose veineuse, crise de goutte, infarctus splénique. La splénomégalie modérée est le signe clinique majeur, mais parfois la rate n'est pas palpable au moment du diagnostic.

# IV. Examens biologiques

## A. Hémogramme

L'hémogramme est essentiel au diagnostic. Une forte leucocytose est classique entre $50 \times 10^9$/L et 100 à $300 \times 10^9$/L. La formule leucocytaire est caractéristique. Elle montre 90 à 95 % d'éléments granuleux, une polynucléose neutrophile (entre 30 et 40 %), une basophilie (3 à 10 %), une éosinophilie (3 à 10 %) et surtout une myélémie importante entre 10 et 50 % des éléments de la formule. La myélémie est constituée surtout de myélocytes, de métamyélocytes, de quelques promyélocytes et très rarement de quelques myéloblastes. Ces cellules ont une morphologie normale. Le chiffre des globules rouges est normal. Le chiffre des plaquettes est modérément élevé 500 à $600 \times 10^9$/L.

## B. Moelle osseuse

- Le *myélogramme* affirme le syndrome myéloprolifératif. Il est très riche et comporte plus de 80 % de cellules granuleuses. Tous les stades de maturation sont représentés avec un léger excès de myéloblastes et promyélocytes. Une éosinophilie et une basophilie sont constantes. Les érythroblastes sont diminués en pourcentage (< 5 %). Les mégacaryocytes souvent polymorphes et dystrophiques sont nombreux.
- La *biopsie médullaire* confirme le syndrome myéloprolifératif. Elle montre une grande hyperplasie du tissu myéloïde avec disparition du tissu adipeux. Les cellules granuleuses représentent l'essentiel de cette hyperplasie. Les mégacaryocytes sont nombreux et dystrophiques. Les îlots d'érythroblastes sont très rares. Il n'existe pas de fibrose de la trame de réticuline.

## C. Caryotype et biologie moléculaire

L'analyse cytogénétique se fait sur le produit d'aspiration médullaire et/ou sur les cellules du sang, à condition qu'il y ait une myélémie. Le chromosome Ph est présent chez 95 % des malades. La translocation est de type standard t(9q+;22q–). Dans 5 % des cas, il s'agit d'une translocation variante, intéressant le chromosome 22 et un chromosome différent du 9, donnant un gène de fusion bcr/abl. Chez 5 % des patients, on ne retrouve pas le Ph. Il s'agit alors d'un chromosome Ph masqué par une translocation complexe ou d'autres anomalies diverses. Dans ces cas et dans d'autres, où le caryotype peut même être apparemment normal, on retrouve un réarrangement du gène bcr en complétant l'étude cytogénique par une étude en biologie

moléculaire. La mise en évidence du gène de fusion utilise l'hybridation *in situ* et la RT-PCR (*reverse transcritpase-polymerase chain reaction*).
L'*hybridation* in situ *fluorescente* (FISH) emploie des sondes spécifiques de bcr/abl en double coloration, permettant de mettre en évidence la fusion dans les cellules en métaphase et les noyaux en interphase. La FISH permet l'observation d'un grand nombre de cellules : c'est un de ses avantages.
La RT-PCR permet de mettre en évidence l'ARN (acide ribonucléique ribosomique) de fusion bcr-abl avec une extrême sensibilité. Elle est retrouvée chez 50 % des patients pour lesquels la cytogénétique était négative.

### D. Autres examens biologiques

- Hyperuricémie et hyperuraturie sont fréquentes.
- La vitaminémie $B_{12}$ est élevée, corrélée à l'hyperleucocytose.
- Le lysozyme sérique et urinaire peut être élevé.
- L'exploration fonctionnelle des plaquettes montre une thrombopathie acquise.
- Les cultures des progéniteurs hématopoïétiques montrent une augmentation des précurseurs pluripotents et granulomonocytaires. On trouve également ces progéniteurs en nombre élevé dans le sang.

## V. Diagnostic différentiel

La distinction est généralement aisée entre LMC, hyperleucocytose réactionnelle avec myélémie et les autres syndromes myéloprolifératifs.

### A. Myélémies réactionnelles

Les myélémies réactionnelles accompagnent des circonstances cliniques diverses : syndromes infectieux, grande hémolyse, métastases médullaires. La leucocytose et la myélémie sont modérées sans basophilie. Le caryotype est normal.

### B. Syndromes myéloprolifératifs

#### 1. Splénomégalie myéloïde

La splénomégalie est volumineuse. L'hyperleucocytose inférieure à $20 \times 10^9/l$. La myélémie discrète est associée à une érythroblastose et à une dystrophie des globules rouges. La biopsie de moelle montre une réticulofibrose. Il n'existe pas de Ph.

#### 2. Polyglobulie primitive

Les critères de la polyglobulie à l'hémogramme sont dominants. L'hyperleucocytose est modérée, la myélémie est absente ou très discrète. Il n'existe pas de chromosome Ph.

### 3. Thrombocytémie

Le chiffre des plaquettes est supérieur à 800 G/L. L'hyperleucocytose est modérée, la myélémie peu fréquente ou inférieure à 5 %. Il n'existe pas de chromosomes Ph.

### 4. Leucémie myélomonocytaire chronique

Le diagnostic repose sur l'existence d'une monocytose sanguine et médullaire associée à des aspects de myélodysplasie. La leucocytose sanguine est de 20 à $30 \times 10^9/l$. Le lysozyme sanguin et urinaire est élevé. Le caryotype est normal.

### 5. Leucémies aiguës

Le diagnostic se pose dans les transformations aiguës d'emblée de LMC ou de celles dont la phase chronique est passée inaperçue. Lorsque la rémission est obtenue, on retrouvera les anomalies hématologiques de la LMC et des cellules Ph+.
Les leucémies aiguës lymphoblastiques Ph positif montrent des anomalies moléculaires différentes dans d'autres régions de points de cassure. La protéine de fusion a une activité tyrosine kinase à un très haut potentiel de transformation.

# VI. Évolution

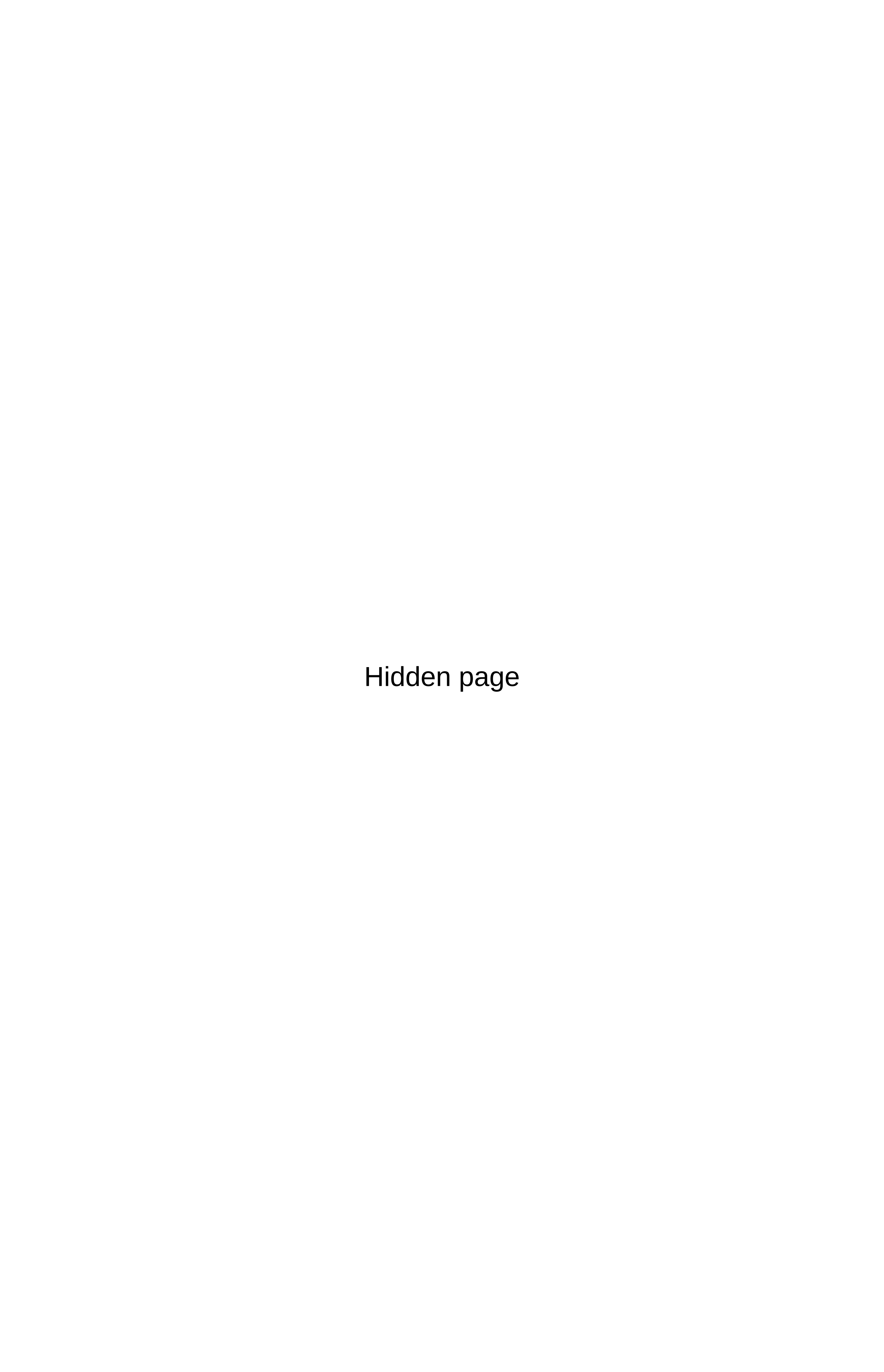
La leucémie myéloïde chronique évolue en trois phases : la phase myélocytaire chronique, la phase d'accélération et la phase de transformation en leucémie aiguë.

## A. Phase myélocytaire chronique

La phase myélocytaire chronique est celle du moment du diagnostic. Elle est d'abord favorable, sauf si la maladie a été d'emblée révélée par des complications liées à une très grande hyperleucocytose (goutte, thromboses veineuses). En dehors de ces cas, la maladie est contrôlée par la thérapeutique. L'hémogramme se corrige totalement en un à trois mois. La splénomégalie disparaît. Le chromosome Ph disparaît du sang mais il persiste dans la moelle. Le myélogramme montre une cellularité normale et une disparition de l'hyperplasie granuleuse.
Une stabilisation de durée variable est obtenue, mais on ne peut pas parler de rémission complète. Plusieurs phases alternant rémission et rechute peuvent être observées avec des rémissions moins complètes et plus brèves.

## B. Phase d'accélération

La phase d'accélération se caractérise par une résistance progressive aux traitements et précède la survenue de la transformation aiguë. L'état général est altéré, le volume de la rate est augmenté, une anémie s'installe. Le myélogramme montre une augmentation du pourcentage des promyélocytes et myéloblastes de 10 à 20 %. Une fibrose peut apparaître dans la moelle.



logique est obtenue chez 80 % des patients en quatre mois. La disparition totale des cellules Ph+ est obtenue dans 20 % des cas. Elle est partielle dans 25 % des cas. Lorsque la rémission cytogénétique est complète, la survie à huit ans peut être espérée chez 80 % des patients. Globalement, quelle que soit la réponse cytogénétique, le traitement par interféron améliore la survie de l'ensemble des patients et permet une médiane de survie autour de 70 mois.

### 5. Imatinib (Glivec®)

L'imatinib est un inhibiteur compétitif sélectif et puissant de l'activité tyrosine kinase de la protéine bcr-abl. *C'est aujourd'hui le traitement de première intention.* Il est utilisé à la dose de 400 mg/j *per os*. Il permet d'obtenir des réponses hématologiques classiquement en trois mois, et 60 % de réponses cytogénétiques majeures, dont 40 % de réponses cytogénétiques complètes.
Les effets secondaires sont fréquents : nausées, diarrhée, crampes, œdèmes et éruptions cutanées. Ils sont exacerbés chez les sujets âgés. Cependant, ils conduisent rarement à l'arrêt du traitement. En raison du risque de neutropénie et de thrombopénie, une surveillance régulière de l'hémogramme doit être pratiquée tous les quinze jours pendant trois mois.
Des résistances au traitement et divers mécanismes sont connus : sur-expression du gène MDR (*multidrug resistance*), mutations acquises ou préalables au traitement du domaine kinase de bcr-abl, mécanismes bcr-abl indépendants. Dans ces cas, une augmentation de la posologie peut parfois être efficace.

### 6. Greffe de moelle

Seule la *greffe allogénique* de moelle permet l'éradication durable des cellules Ph. Elle peut être réalisée en phase chronique dans la première année suivant le diagnostic, de préférence chez les patients les plus jeunes, à partir de la moelle d'un donneur de la fratrie, HLA (*human leukocyte antigen*) identique et après conditionnement par irradiation corporelle ou cyclophosphamide. On observe cependant une mortalité globale de 30 % liée à la maladie du greffon contre l'hôte ou à des complications infectieuses. La survie à cinq ans est de 60 %. La surveillance des patients greffés est fondée sur l'analyse cytogénétique. La recherche par PCR (*polymerase chain reaction*) des cellules Ph+ aide à prévoir les rechutes cytogénétiques qui seront suivies de rechutes hématologiques. Le risque de rechute est de 12 %. Dans ces cas, le traitement par interféron permet l'obtention d'une nouvelle rémission complète.
Dans les cas où l'allogreffe est impossible, une *autogreffe de cellules souches sanguines* peut être envisagée après traitement par interféron et obtention de l'éradication du chromosome Ph.

## B. Traitement de la transformation aiguë

Les chimiothérapies habituelles sont peu efficaces. On peut proposer l'autogreffe de moelle permettant la réinjection des cellules. La survie est de quelques mois.
L'imatinib, à la dose de 600 à 800 mg/j, permet d'obtenir une réponse hématologique dans 30 % des cas et 15 % de réponses cytogénétiques majeures. Les réponses s'observent aussi bien dans les transformations aiguës myéloïdes que lymphoïdes. La médiane de survie est alors prolongée de six mois.

# Les leucémies aiguës

P. GAUSSEM, Service d'hématologie biologique, Hôpital européen Georges Pompidou, Paris.
A. VINCENOT, Service d'hématologie biologique, Hôpital de Meaux.

*Les leucémies aiguës (LA) sont des hémopathies malignes définies par une prolifération clonale de précurseurs lymphoïdes (LAL) ou myéloïdes (LAM) dans la moelle osseuse et, dans la majorité des cas, dans le sang et les autres tissus. Ces cellules sont bloquées à un stade plus ou moins précoce de leur maturation (hiatus) et représentent plus de 30 % des cellules médullaires dans la classification FAB de référence, alors que ce seuil est abaissé à 20 % dans la plus récente classification de l'OMS (1999).*

# I. Étiologie

Les LAL représentent 80 % des leucémies, 35 % des cancers chez l'enfant entre 2 et 10 ans, et 20 % des leucémies de l'adulte, surtout après 70 ans. Les LAM sont plus rares et surviennent à tout âge bien qu'il existe un pic de fréquence chez l'enfant de moins de 5 ans et un second chez l'adulte de plus de 40 ans. Un certain nombre de facteurs prédisposants sont connus. Tous d'origine génétique, ils sont constitutionnels (trisomie 21, maladie de Fanconi, etc.) ou acquis (irradiations, exposition au benzène, traitement par les agents alkylants). Ils entraînent l'altération de gènes contrôlant la prolifération et la différenciation cellulaires avec, pour conséquence, une prolifération clonale incontrôlée de progéniteurs hématopoïétiques incapables de se différencier en cellules matures. Certaines hémopathies comme la leucémie myéloïde chronique, l'hémoglobinurie paroxystique nocturne et certaines myélodysplasies se transforment fréquemment en leucémies aiguës.

# II. Physiopathologie

Le processus initial de leucémogenèse provient, comme tout processus cancéreux, de la conjonction d'une accumulation de mutations activant des proto-oncogènes (comme N-Ras), ou inhibant des gènes suppresseurs de tumeurs (tel P53). Dans le cas spécifique des leucémies, les principaux oncogènes impliqués sont situés au niveau des points de cassure des translocations chromosomiques qui leur sont associées. Dans certains cas, il y a apparition de protéines de fusion leucémogènes intervenant soit dans la transmission du signal d'activation (kinases), soit dans la régulation de l'expression des gènes (facteurs de transcription). Ces gènes de fusion représentent aujourd'hui des facteurs pronostiques indépendants.

# III. Clinique

L'expression clinique de la maladie est polymorphe. Elle comprend généralement un ou plusieurs des signes suivants :

peu différenciés. La *myéloperoxydase* (MPO) est positive dans les LAM (excepté dans les LAM 6 et 7). La réaction des *estérases* non spécifiques est positive dans les LAM et inhibée par action de fluorure de sodium dans la lignée monocytaire : toutefois, cette dernière réaction n'est presque plus pratiquée en raison de la disparition des réactifs permettant de la réaliser.

### 2. Phénotype

Il s'agit de l'étude des marqueurs membranaires par cytométrie de flux à l'aide d'anticorps monoclonaux fluorescents. Cet examen peut être réalisé sur le sang, s'il y a beaucoup de blastes circulants, ou sur la moelle, après un éventuel isolement des cellules par gradient de Ficoll. Il est désormais indispensable au diagnostic et permet, entre autres, la classification d'une LA en cas de blastes indifférenciés morphologiquement.

### 3. Caryotype

Cet examen est indispensable, puisqu'il fait partie intégrante du pronostic, certaines anomalies étant en effet associées à une meilleure survie ou à une meilleure réponse au traitement. Il est anormal dans plus de 70 % des cas. Ces anomalies disparaissent en période de rémission.

### 4. Étude moléculaire

Elle permet de mettre en évidence des anomalies connues (translocations le plus souvent) par hybridation de fluorescence *in situ* (FISH) ou par RT-PCR. Elle est la base du diagnostic de la *maladie résiduelle* après traitement, quand un gène de fusion est identifié (LAM), par mise en évidence du réarrangement des gènes des immunoglobulines (LAL B) ou du récepteur à l'antigène, le TCR (LAL T). Ces méthodes sont plus sensibles que la cytogénétique, mais la signification clinique d'une maladie résiduelle moléculaire reste encore à établir.

### 5. Anomalies biologiques

Le diagnostic de LA s'associe souvent à une hyperuricémie, une hyperkaliémie, une hypocalcémie, et à une augmentation des LDH qui reflète la masse tumorale. Une fausse hypoglycémie peut être observée, consécutive à la consommation du glucose par les blastes *in vitro*. Un bilan d'hémostase doit être réalisé à la recherche d'un syndrome de consommation (CIVD).

## V. Classification FAB des LA

La classification FAB (franco-américano-britannique) définit trois types de LAL et huit types de LAM initialement nommés en fonction des formes cytologiques. S'y ajoutent les critères immunologiques, cytochimiques et cytogénétiques. Toutes ces données sont résumées dans le *tableau* et la *figure* suivants.

**Tableau 1.** Classification FAB des leucémies aiguës myéloblastiques (LAM)

| | LAM 0 | LAM 1 | LAM 2 | LAM 3 | LAM 4 | LAM 5 | LAM 6 | LAM 7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cytologie | Blastes indifférenciés | Myéloblastes sans maturation | Myéloblastes avec maturation<br>Présence fréquente de corps d'Auer | Promyélocytes souvent hypergranuleux | Myéloblastes avec ± maturation.<br>Dans la moelle, la lignée monocytaire est > 20 % | Monoblastes sans maturation (LAM 5a) ou avec maturation (5b) | Dans la moelle, les érythroblastes sont > à 50 % avec > 30 % de blastes myéloïdes | Mégacaryoblastes > 30 % associés ou non à des blastes d'autres lignées |
| Myéloperoxydase (MPO) | Négative | > 3 % des blastes positifs | + + | + + | + | ±<br>(esterase +) | Négative | Négative |
| Phénotype | HLA DR+<br>CD 33+<br>CD 13+<br>CD 34+<br>CD 16-<br>MPO Ag+ | HLA DR+<br>CD 33+<br>CD 13+<br>CD 34+<br>CD 16- | HLA DR+<br>CD 33+/-<br>CD 13+<br>CD 34+/-<br>CD 16+ | HLA DR-<br>CD 9+<br>CD 33+<br>CD 13+<br>CD 34- | HLA DR+<br>CD 13+<br>CD 14+ < 50 %<br>CD 36+ < 50 % | HLA DR+<br>CD 13+<br>CD 14+ > 50 %<br>CD 36+ > 50 % | HLA DR+<br>CD 33+<br>CD 36+<br>Glycophorine A+ | CD 41b+(GP IIb)<br>CD 42b+ (GP Ia)<br>CD 61+(GP IIIa) |
| Cytogénétique | Monosomie 5q, 7q<br>Anomalies complexes | t(9;22)<br>Trisomie 8<br>Monosomie 7 | t(8;21) : 25 % des cas mais le transcrit LAM1/ETO dans 60 % des cas | t(15;17)<br>transcrit PML/RARα : 100 % des cas | t(6;9)<br>inv(16) ou t(16;16) :<br>transcrit CBF ≤/MYH 11<br>(formes M4éosino) | t(4.11)<br>t(6;11)<br>t(9;11)<br>t(11;19) | Anomalies complexes dans plus de 75 % des cas | Trisomie 21 |
| Pronostic | Péjoratif | | Favorable si t(8;21) | Favorable | Favorable | | Péjoratif | Très péjoratif |
| Particularités | | | | CIVD*<br>Tricytopénie | Atteintes cutanées et gingivales | Atteintes cutanées et gingivales | | Myélofibrose |

* Syndrome de coagulation intravasculaire disséminée.

# VI. Classification OMS des LA

L'OMS a proposé récemment une nouvelle classification de toutes les maladies hématologiques. Cette nouvelle classification prend en compte la génétique et la clinique en plus de l'observation morphologique, cytochimique et immunophénotypique. En ce qui concerne les leucémies aiguës, le nombre de blastes médullaires conduisant au diagnostic n'est plus de 30 % mais de *20 %*.
La classification LAL 1, LAL 2 et LAL 3 est remplacée par trois types de LAL :

- les LAL à précurseurs B, avec plusieurs sous-groupes en fonction des anomalies génétiques ;
- les LAL à précurseurs T ;
- les LAL de type Burkitt.

Dans chaque sous-groupe, la cytogénétique est à considérer comme facteur pronostique.
Dans le cas des LAM, la classification de l'OMS permet de différencier les LA de bon pronostic (avec translocations récurrentes comme t(8;21), inv(16), t(15;17), etc.) et les LAM de plus mauvais pronostic (avec signes de myélodysplasie, secondaires à un traitement par chimiothérapie ou à un syndrome myéloprolifératif, peu différenciées, LAM 5, 6, 7, LA biphénotypiques).

# VII. Diagnostic différentiel

Un diagnostic de *LAM* peut être envisagé en cas de blocage de maturation de la lignée granuleuse, d'origine médicamenteuse notamment. Un diagnostic de *LAL* peut être évoqué dans certains syndromes mononucléosiques et syndromes lymphoprolifératifs, particulièrement en phase leucémique de lymphome.

# VIII. Facteurs pronostiques

## A. LAM

La présence de translocations t(8;21) et t(15;17) est un facteur de bon pronostic. En revanche, sont de mauvais pronostic : un âge avancé ou bien inférieur à 1 an, le caractère secondaire de la LA, l'aspect cytologique (LAM 7, le moins favorable), les anomalies cytogénétiques associées (t(9-22), délétion 11q23, anomalies complexes, trisomie 8, 5q-), l'importance du syndrome tumoral (leucocytose, hépato et/ou splénomégalie), les facteurs liés à la résistance aux médicaments de la cellule leucémique (gène de résistance MDR, *multidrug resistance*, phase S longue, etc.), la persistance des blastes au 28$^{e}$ jour de traitement, l'absence de rémission complète après traitement.

## 2. LAM 3

L'acide tout-transrétinoïque (ATRA) permet d'induire la maturation des cellules et l'obtention de la RC complète dans près de 100 % des cas. Il s'agit du premier traitement fondé spécifiquement sur une anomalie génétique acquise, la translocation t(15-17). Toutefois, l'association d'une chimiothérapie conventionnelle est impérative pour éviter les rechutes.
Actuellement, l'utilisation de composés arsenicaux, à l'étude pour le traitement initial ou celui de la rechute, démontre une réelle efficacité.

## 3. Traitement des LAL

- La phase d'*induction* vise à obtenir la RC en détruisant massivement les cellules leucémiques. Il est habituel de procéder à une administration préalable de corticoïdes. Une injection intrathécale de méthotrexate est réalisée pour prévenir l'atteinte du système nerveux central, associée à une éventuelle irradiation encéphalique.

*Exemple* : daunorubicine (Cérubidine®) + vincristine (Oncovin®) + asparaginase (Kidrolase®) + prednisone (Solupred®).

- La phase de *consolidation* repose sur l'utilisation de médicaments différents pour éviter la sélection de clones résistants.

*Exemple* : daunorubicine (Cérubidine®) + vincristine (Oncovin®) + cytarabine (Aracytine®) + 6-thioguanine (Lanvis®), mais aussi VP 16 (Vépéside®), méthotrexate, cyclophosphamide, etc.

- Une phase d'*intensification* à base phase de chimiothérapie lourde, similaire à l'induction, est réalisée trois ou quatre mois après l'obtention de la RC. Son principal intérêt réside dans les formes à haut risque de rechute.
- La phase d'*entretien* a pour but d'éradiquer la maladie résiduelle et se prolonge durant deux ou trois ans.

*Exemple* : mercaptopurine (Purinethol®) + méthotrexate.
*Résultats* : les résultats sont bons chez l'enfant, avec 95 % de guérison après cinq ans malgré des cas de séquelles neurologiques. Chez l'adulte, il existe 70 % de rémission mais seulement 10 à 25 % de guérison après cinq ans.

# C. Greffe de moelle osseuse

## 1. Allogénique

L'allogreffe est réalisable s'il existe un donneur HLA compatible et si le patient a moins de 55 ans en cas de donneur familial, et moins de 40 ans en cas de donneur non apparenté. Elle est réalisée après chimiothérapie à haute dose et irradiation corporelle totale. Elle concerne les LA en première RC de l'adulte s'il existe au moins un critère de mauvais pronostic et les LA de pronostic très sévère ou en seconde RC chez l'enfant, car la chimiothérapie donne de meilleurs résultats en première intention. Les risques principaux sont la réaction du greffon contre l'hôte, le rejet, les infections par déficit immunitaire. Dans certains protocoles (LAL), on administre du G-CSF pour diminuer la durée de l'aplasie chimio-induite lors de la greffe.

# L'essentiel de la question

Les leucémies aiguës (LA) représentent un ensemble de pathologies hétérogènes, par l'origine cellulaire en cause, par les anomalies cytogénétiques retrouvées, par l'âge de leur survenue et par leur réponse au traitement. Le diagnostic du cytologiste s'est trouvé considérablement amélioré par le phénotypage immunologique des cellules leucémiques, notamment pour les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL). L'essor de la cytogénétique et de la biologie moléculaire a contribué à l'ébauche d'une nouvelle classification prenant en compte la clinique et les facteurs pronostiques. Cela a permis l'élaboration de protocoles de chimiothérapie plus agressifs pour les LA de mauvais pronostic, permettant l'obtention d'un meilleur taux de rémission. Il est admis que le traitement des LAL de l'enfant, selon des protocoles précis et assez universellement admis, conduit à de bons résultats en termes de survie à long terme. En dehors des cas de LA myéloblastiques à promyélocytes avec t(15;17), le traitement des LAM à base de chimiothérapie conventionnelle a peu évolué dans les dernières années et les chances de guérison restent faibles. De plus, les résultats des greffes de moelle sont assez décevants. Aussi, de nouveaux concepts thérapeutiques commencent à voir le jour.

***Pour en savoir plus***


- Sebahoun G. *Hématologie clinique et biologique*. Arnette, 1998.
- Varet B. *Le Livre de l'interne : hématologie*. Flammarion Médecine-Sciences, 1997, Paris.
- Dreyfus B. *L'Hématologie*. Paris, Médecine-Sciences Flammarion, 1992.
- Thomas X., Thiebaut A., Fière D. Leucémies lymphoblastiques aiguës (adulte et enfant). *La Revue du praticien*, 1997, 47 : 2297.
- Castaigne S. Leucémie aiguë myéloblastique. *La Revue du praticien*, 1999, 49 : 757.
- Harris L., Jaffe E.S., Diebold J. *et al.* World Health Organisation classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues : report of the clinical advisory committee meeting. Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999 ; 17 : 3835-49.
- Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H *et al. World Health Organisation classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. JW Vardiman Edts, Lyon, IARC Press, 2001.

# Maladie de Kahler (myélome multiple)

V. SIGURET, C. BOCCARA
Service d'hématologie biologique, Groupe hospitalier Charles Foix – Jean Rostand (AP-HP), Ivry-sur-Seine.

# VIII. Évolution

# IX. Traitements

A. Chimiothérapie standard
B. Thalidomide
C. Bortezomib (Velcade®)
D. Autogreffes de moelle
E. Allogreffes de moelle
F. Radiothérapie
G. Traitement de l'hypercalcémie
H. Anémie
I. Infections
J. Insuffisance rénale

lymphoïdes B en plasmocytes matures sécrétant des Ig. Dans le myélome, la sécrétion de l'IL6 ne serait pas autocrine mais paracrine : en effet, l'IL6 serait produite par les cellules du microenvironnement médullaire. La production d'IL6 est induite par une autre interleukine, l'IL1β, sécrétée par les plasmocytes malins eux-mêmes, grâce à des interactions entre plasmocytes malins et microenvironnement impliquant différentes molécules d'adhésion. L'interaction de l'IL6 avec ses récepteurs (IL6R) met en jeu une chaîne glycoprotéique α de 80 kD, site de liaison de l'IL6, et une chaîne glycoprotéique transmembranaire β de 130 kD (gp130). La liaison de l'IL6 à son récepteur induit l'activation de la gp130, impliquée dans la transduction du signal jusqu'au noyau de la cellule myélomateuse. De plus, il existe une forme soluble du récepteur à l'IL6 (sIL6R) sécrétée par les plasmocytes malins eux-mêmes, capable de se lier à l'IL6 et potentialisant l'action proliférative de celle-ci. Il est intéressant de noter que des taux plasmatiques élevés de sIL6R sont corrélés à un mauvais pronostic.

## B. Destruction osseuse

La destruction osseuse résulte d'un recrutement et de l'activation des ostéoclastes au contact des plasmocytes malins (voir *figure*). Les facteurs qui en sont responsables (*osteoclast activating factors* ou OAF) regroupent de multiples cytokines dont les principales sont RANK ligand, IL1, IL6, HGF, MIP-1α.

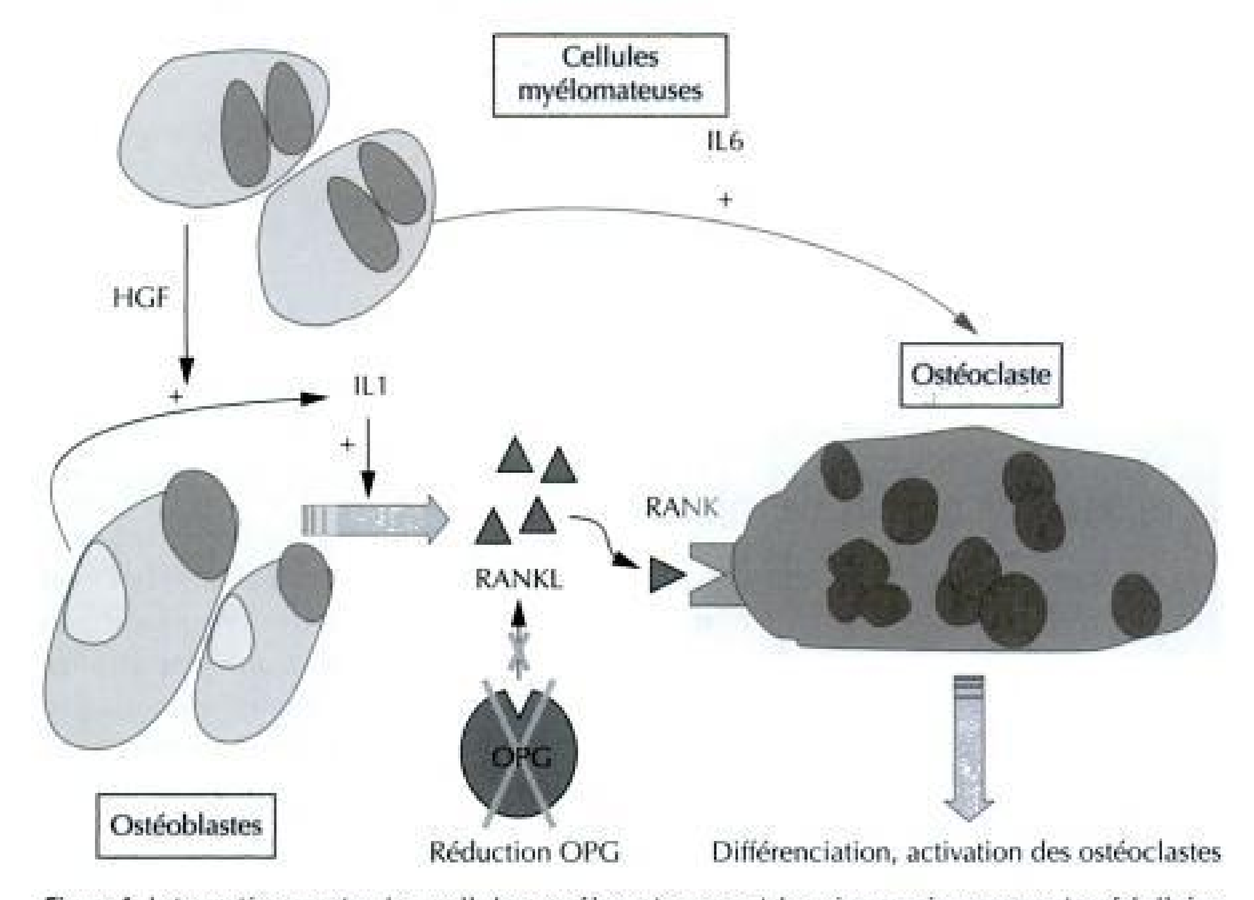



**Figure 1.** Interactions entre les cellules myélomateuses et le microenvironnement médullaire

sont responsables de 20 à 50 % des décès dans l'évolution du myélome, le risque infectieux étant majoré par la chimiothérapie ;
- *manifestations liées à l'hyperviscosité* : quand l'Ig est produite en très grande quantité, il peut apparaître des troubles oculaires, céphalées, etc. ;
- *manifestations hématologiques* : elles sont liées aux signes d'insuffisance médullaire – anémie, thrombopénie et/ou thrombopathie avec troubles de l'hémostase (peu fréquent) –, leucopénie. Elles contribuent à l'altération de l'état général (asthénie, pâleur) et sont également majorées par la chimiothérapie.

Il faut noter qu'il n'y a en général pas d'organomégalie (ni splénomégalie, ni hépatomégalie, ni adénopathies).

# V. Diagnostic biologique et facteurs pronostiques

## A. Bilan hématologique

### 1. Hémogramme

Les résultats montrent de manière inconstante une anémie modérée, normochrome, normocytaire, arégénérative. La thrombopénie et/ou la leucopénie sont rares au début de la maladie mais apparaissent au cours de l'évolution. L'examen attentif du frottis sanguin permet de mettre en évidence la présence d'hématies en rouleaux sur le frottis quand l'Ig monoclonale est à un taux élevé, ce qui est très évocateur d'une dysglobulinémie.

*Remarque* : tout au moins au début de l'affection, il n'y a pas de passage dans le sang des plasmocytes malins. En phase terminale, en revanche, une plasmocytose périphérique peut apparaître.

### 2. Vitesse de sédimentation

Elle est le plus souvent accélérée, liée à la présence de l'Ig monoclonale. Elle est parfois supérieure à 100 mm à la première heure.

### 3. Myélogramme

Il est indispensable à la confirmation du diagnostic. Il permet de mettre en évidence une infiltration de la moelle par des plasmocytes souvent dystrophiques. L'infiltration plasmocytaire est variable. Pour affirmer le myélome, il faut retrouver plus de 10 % de plasmocytes dans la moelle. Dans 10 % des cas, la plasmocytose médullaire est normale (< 5 %), mais les plasmocytes présentent des signes de malignité. Ce peut être aussi le témoin d'une infiltration plasmocytaire inhomogène dans la moelle : dans ce cas, on pourra renouveler la ponction dans un autre territoire ou bien réaliser une biopsie ostéomédullaire (BOM). En cas d'échec du myélogramme, en cas de myélofibrose notamment, une BOM est indispensable pour confirmer l'infiltration plasmocytaire.

Dans la moitié des cas, les plasmocytes présentent des anomalies morphologiques qui sont principalement nucléaires (chromatine décondensée ou fine, nucléole

apparent, noyau volumineux, bi- ou trinucléarité). La morphologie des plasmocytes est normale chez la moitié des patients. Le cytoplasme est parfois réduit ou contient de nombreuses vacuoles (cellules de Mott), mais ces anomalies cytoplasmiques ne sont pas spécifiques du myélome.
Un immunomarquage des plasmocytes sur le frottis de moelle par immunofluorescence est possible en cas de difficulté diagnostique. Les principaux marqueurs retrouvés sont les CD24, CD38, CD56. Il n'est jamais fait en pratique, sauf dans les exceptionnels myélomes non sécrétants où il y a une absence totale de chaîne monoclonale sécrétée.

## B. Bilan biochimique

### 1. Dosage des protéines plasmatiques totales (ionogramme sanguin)

Une hyperprotidémie est très fréquente, pouvant dépasser 100 g/L, d'autant plus importante que l'Ig est produite en grande quantité.

### 2. Électrophorèse des protéines sériques

C'est simplement un examen d'orientation. Elle est pratiquée à la recherche d'un pic étroit d'allure monoclonale. Habituellement, le pic est situé dans les $\gamma$- ou $\beta$-globulines, évoquant plutôt une IgG ou une IgA, exceptionnellement IgD ou IgE (voir *figure*). Parfois, ce pic est difficile à voir, car situé dans les $\alpha$2-globulines et de faible intensité. L'évaluation semi-quantitative de l'Ig monoclonale est réalisée par intégration du pic sur l'électrophorèse des protéines sériques (voir *figure*). C'est l'un des points majeurs de la classification de Salmon et Durie pour la détermination du stade au début de la maladie et, surtout, c'est le marqueur utilisé pour le suivi du patient lors du traitement.

### 3. Bilan de la fonction rénale

Elle comprend un ionogramme sanguin et urinaire, une clairance de la créatinine ainsi que la recherche et le dosage d'une protéinurie des 24 heures. Elle permet de déterminer l'importance de l'atteinte rénale en cas de néphropathie.
*Attention* : la présence de chaînes légères libres dans les urines n'est pas détectée par les bandelettes urinaires. Leur recherche par immuno-fixation est indispensable dans un bilan de myélome (voir *infra*).

### 4. Bilan phosphocalcique

Il est indispensable, l'hypercalcémie étant un facteur de mauvais pronostic et parfois une urgence thérapeutique.

### 5. Divers

Des taux sériques élevés de protéine C réactive (CRP), de LDH, et surtout de la $\beta$2-microglobuline sont des facteurs de mauvais pronostic, liés à l'importance de la masse tumorale. Un taux diminué de l'albumine sérique est également de mauvais

pronostic (*tab.* 2). Le taux sérique de CD56 soluble est le plus souvent élevé dans le myélome et est un bon marqueur pronostique.

## C. Bilan immunologique

### 1. Immunofixation du sérum (IF)

Elle est indispensable afin de confirmer le caractère monoclonal de l'Ig et d'en déterminer l'isotype. Cette technique est rapide, facile à mettre en œuvre, et très sensible. Le principe de l'IF est le suivant : les protéines sériques sont séparées par électrophorèse sur gel d'agarose. Dans un second temps, le gel est incubé en présence des différents antisérums monovalents antichaînes lourdes (γ, α ou μ, exceptionnellement δ ou ε), et des antisérums antichaînes légères (κ et λ), puis coloré. Les Ig monoclonales apparaissent sous forme de bandes intenses et étroites (voir *figure*). L'IF peut dans certains cas permettre de mettre en évidence des anomalies de répartition des Ig appelées « restriction d'hétérogénéité », dont la signification clinique est variée : elle peut évoluer vers une pathologie monoclonale. Il y a donc lieu, dans ce cas, de répéter l'examen à distance (six mois). Désormais, certains fabricants proposent des gels associant, pour chaque sérum de patient, une piste d'électrophorèse des protéines sériques (voir *supra*) et une piste d'IF sur laquelle sera déposé un antisérum pentavalent (anti-γ, α, μ, κ et λ). En cas de détection d'une bande étroite, le biologiste pourra d'emblée réaliser une IF classique à l'aide d'un antisérum monovalent.

### 2. Recherche de la protéine de Bence-Jones (BJ) dans les urines

Il s'agit de détecter dans les urines les chaînes légères libres monoclonales (κ ou λ). La recherche de BJ consiste aujourd'hui à pratiquer une immunofixation des protéines urinaires, à l'aide d'antisérums antichaînes légères (κ et λ), après concentration éventuelle des urines de 24 heures. Historiquement, la recherche de BJ était fondée sur les propriétés de thermoprécipitation mais cette méthode peu sensible a complètement été abandonnée.

### 3. Dosage des IgG, IgA et IgM

Il s'agit d'un dosage quantitatif des Ig, réalisé par immunonéphélémétrie. La diminution des Ig polyclonales est fréquente. Les Ig monoclonales pouvant avoir une immunoréactivité différente des Ig polyclonales, le résultat du dosage de ces Ig peut s'en trouver faussé. C'est pourquoi il est plus juste, quand cela est possible, d'intégrer le pic d'Ig monoclonale de l'EP des protéines sériques pour le suivi des patients (pic suffisamment important). En tout état de cause, il est recommandé, pour chaque patient, de toujours utiliser la même technique pour la quantification de l'Ig monoclonale.

### 4. Recherche d'une cryoglobuline sérique

Elle n'est que très rarement retrouvée. Il s'agit le plus souvent d'une cryoglobuline de type I, composée d'immunoglobine monoclonale IgM, IgG ou IgA. Elle peut être à l'origine de manifestations cliniques liées à sa précipitation intravasculaire superficielle ou profonde.

### D. Bilan cytogénétique

La recherche d'anomalies cytogénétiques plasmocytaires clonales acquises repose sur des techniques de FISH (hybridation *in situ* en fluorescence) sur des prélèvements médullaires. Elle permet de mettre en évidence des anomalies fréquentes, dont certaines sont de mauvais pronostic : délétions totales (monosomies 13) ou partielles (13q-) et remaniements du bras long du chromosome 14.

## VI. Classification

### A. En fonction du typage de l'Ig monoclonale

Les myélomes les plus fréquents sont ceux à IgG (65 %), puis, par ordre décroissant, IgA (25 %), IgD (1 ou 2 %), IgE et IgM (exceptionnels). De plus, il existe une forme clinique de myélome à chaîne légère (8 à 10 % des cas), où seules les chaînes légères d'Ig sont excrétées. Dans 10 à 20 % des cas, il n'y a pas de sécrétion de l'Ig totale dans le plasma mais uniquement de la chaîne légère, κ ou λ, définissant ainsi les myélomes dits « à chaînes légères ». Enfin, dans de rares cas, il n'y a pas du tout de sécrétion d'Ig : il s'agit de myélomes dits « non sécrétants ». Dans tous les cas, le type κ est deux fois plus fréquent que le type λ. Les myélomes les plus graves sont ceux à IgD, à IgA et à chaînes légères.

### B. Classification de Durie et Salmon (1975)

Elle permet d'évaluer l'importance de la masse tumorale et de distinguer trois stades, classés par ordre de gravité croissante (*tab. 1*).

**Tableau 1.** Classification de Durie et Salmon

| |
|---|
| **Stade I** : masse tumorale faible (< $0,6.10^{12}$ cellules/m²)<br>**Tous les critères suivants doivent être remplis :**<br>– Hb > 10 g/100 ml<br>– calcémie < 3,0 mmol/L<br>– pas d'ostéolyse ou une seule lésion osseuse<br>– Ig monoclonale plasmatique peu abondante (IgG < 50 g/L, IgA < 30 g/L)<br>– BJ urinaire < 4 g/24 h |
| **Stade II** : masse tumorale intermédiaire (> $0,6.10^{12}$ cellules/m² et < $1,2.10^{12}$ cellules/m²)<br>Ni I, ni III |
| **Stade III** : masse tumorale élevée (> $1,2.10^{12}$ cellules/m²)<br>**Au moins l'un des critères suivants :**<br>– Hb < 8,5 g/100 ml<br>– calcémie > 3,0 mmol/L<br>– atteintes osseuses diffuses et multiples<br>– Ig monoclonale plasmatique abondante (IgG > 70 g/L, IgA > 50 g/L)<br>– BJ urinaire > 12 g/L |
| Sous-classification : A = fonction rénale normale<br>B = fonction rénale perturbée (créatinine sérique > 160 µmol/L) |

Une nouvelle classification pronostique internationale a récemment été validée. Elle repose sur les dosages sériques de β2-microglobuline et d'albumine (*tab. 2*).

**Tableau 2.** Nouvelle classification pronostique internationale dans le myélome

| Grade de malignité | Paramètres | Médiane de survie (chimiothérapie conventionnelle) |
|---|---|---|
| Stade I | Albuminémie ≥ 35 g/L<br>ET β2-microglobuline < 3,5 mg/L | 62 mois |
| Stade II | Albuminémie < 35 g/L<br>OU 3,5 mg ≤ β2-microglobuline < 5,5 mg/L | 44 mois |
| Stade III | β2-microglobuline ≥ 5,5 mg/L | 29 mois |

# VII. Diagnostics différentiels

## A. Immunoglobuline monoclonale de signification indéterminée

Appelée encore Ig monoclonale bénigne ou dysglobuline monoclonale, elle est très fréquente après 60 ans. Elle ne s'accompagne d'aucune manifestation clinique ou biologique. Son taux est en général réduit et il n'y a pas de diminution des Ig polyclonales. Il n'y a pas d'infiltration médullaire. Une surveillance du taux d'Ig monoclonale sérique s'impose dans la mesure où, au terme de plusieurs années, certains patients peuvent développer un myélome.

## B. Macroglobulinémie de Waldenström

L'Ig monoclonale est une IgM et la prolifération médullaire est lymphoplasmocytaire (*cf.* chapitre « La maladie de Waldenström »).

## C. Plasmocytome isolé

Lésion unique osseuse sans infiltration médullaire, traitée par radiothérapie.

## D. Leucémie à plasmocytes

Elle est exceptionnelle. La prolifération de plasmocytes malins ne s'accompagne d'aucune manifestation osseuse. La plasmocytose périphérique est supérieure à 2 giga/L.

## E. Plasmocytoses médullaires réactionnelles

Elles accompagnent notamment certains cancers ou affections virales. L'infiltration médullaire n'excède pas 5 % en général et les plasmocytes n'ont pas de caractère de malignité.

# VIII. Évolution

La médiane de survie dépend du stade. Elle est comprise entre 30 et 36 mois pour les stades III, malgré les progrès de la chimiothérapie. La mortalité est liée aux infections, à l'insuffisance rénale et aux complications de la chimiothérapie.

# IX. Traitements

Les traitements restent décevants : seuls 5 % des patients survivent au-delà de dix ans.

## A. Chimiothérapie standard

Elle comprend un traitement d'induction puis un traitement d'entretien. La plupart des chimiothérapies associent un agent alkylant, le melphalan (Alkéran®), et un corticoïde, la prednisone ou la dexaméthasone. C'est le traitement classique du myélome. Une anthracycline, l'adriamycine, et/ou un poison du fuseau, la vincristine (Oncovin®), peuvent être associés dans des protocoles de traitement plus intensifs. Malheureusement, les rémissions complètes sont rares. Après une phase de stabilisation de la maladie, le patient échappe habituellement au traitement en raison, notamment, du développement d'une chimiorésistance.

## B. Thalidomide

Indiqué comme antiémétique chez la femme enceinte et responsable de malformations congénitales dans les années 1960, le thalidomide a permis d'obtenir dans des myélomes réfractaires ou en rechute des taux de réponse de 25 à 35 %. En association avec la dexaméthasone, les taux de réponses sont de l'ordre de 50 %, avec des durées médianes de réponse de plus d'un an. Il existe maintenant un analogue de la thalidomide, le lenalidomide (Revlimid®), dépourvu des effets secondaires neurologiques du thalidomide.

## C. Bortezomib (Velcade®)

Inhibiteur du protéasome, est utilisé en traitement de deuxième ligne dans des myélomes réfractaires ou en rechute. Une réponse a été obtenue dans des études de phase II chez 27 à 50 % des patients, avec des durées moyennes de réponse de l'ordre d'un an.

## D. Autogreffes de moelle

Après chimiothérapie intensive initiale, elles ne peuvent être envisagées que jusqu'à 65 ans. Elles sont réalisées après recueil de cellules souches périphériques.

Elles représentent une avancée thérapeutique significative en améliorant la qualité de vie et en augmentant les médianes de survie. Le thalidomide pourrait avoir une place en traitement d'entretien après greffe.

## E. Allogreffes de moelle

Elles ne sont envisageables que chez les rares sujets de moins de 50 ans ayant un donneur HLA compatible dans leur fratrie (5 % des myélomes).
Elles sont seules à permettre des rémissions complètes suffisamment prolongées pour espérer une guérison. La mortalité est de 30 %.

## F. Radiothérapie

Elle permet de diminuer les douleurs osseuses en association avec des antalgiques habituels.

## G. Traitement de l'hypercalcémie

Diurèse forcée, corticothérapie, diphosphonates (acide clondronique = Clastoban®, pamidronate de sodium = Aredia®). Les diphosphonates, puissants inhibiteurs de la résorption osseuse, ont une action bénéfique sur les douleurs osseuses du myélome, raison pour laquelle on ne propose pas d'autre traitement à certains patients très âgés dont le mauvais état général contre-indique toute chimiothérapie.

## H. Anémie

Elle est d'origine multifactorielle. Elle est associée dans le myélome à un taux d'érythropoïétine endogène bas.
Dans la grande majorité des cas, un traitement par l'EPO recombinante entraîne une réponse favorable.

## I. Infections

La vaccination antipneumococcique est indiquée chez ces patients. Les infections doivent être traitées par des associations d'antibiotiques à large spectre. Les Ig IV peuvent être utilisées en prévention secondaire.

## J. Insuffisance rénale

La prévention repose sur une bonne hydratation du malade, plutôt alcalinisante. Il faut éviter les examens radiologiques avec produits de contraste. Pour les patients ayant une insuffisance rénale modérée, la chimiothérapie associée à une hyperhydratation, à la correction de l'hypercalcémie ou de l'hyperuricémie est efficace. L'insuffisance rénale sévère nécessite l'hémodialyse.

# Maladie de Waldenström

S. CHOQUET, L. MUSSET
Service d'hématologie clinique, laboratoire d'immunochimie,
Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, AP-HP, Paris.

systématique la pratique de l'électrophorèse des protides sériques lors de l'exploration des neuropathies.

## 2. Biologique

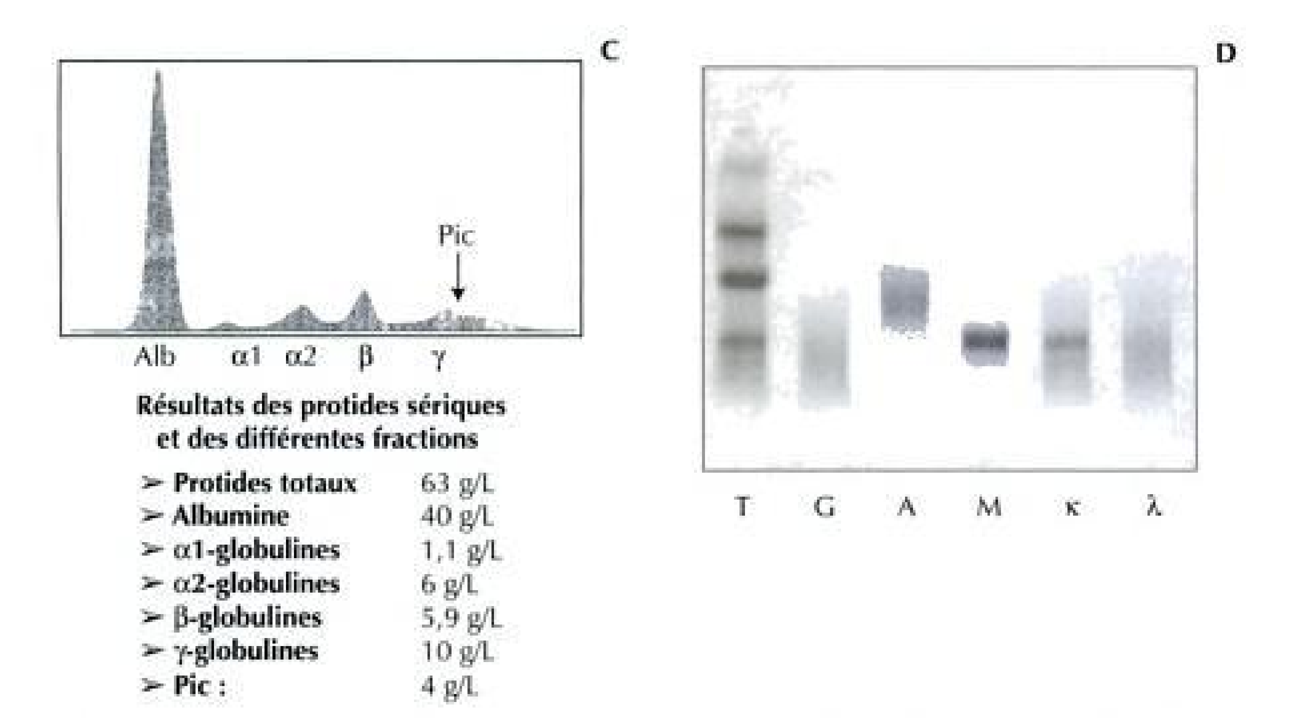
La signature biologique de la maladie de Waldenström est la synthèse et l'excrétion d'une IgM monoclonale par un clone lymphocytaire B. L'expression clinique et biologique de la maladie est étroitement liée à cette IgM. Une immunoglobuline monoclonale correspond à la production en quantité variable d'un seul isotype d'immunoglobuline (même chaîne lourde et même chaîne légère) issu de la prolifération d'un seul clone de cellules B malignes ou hyperstimulées.
En pratique courante, le diagnostic biologique d'une immunoglobuline monoclonale associe des techniques immunochimiques qui permettent de révéler l'homogénéité (même mobilité électrophorétique et mêmes caractéristiques antigéniques) de ces immunoglobulines monoclonales au sein des autres immunoglobulines présentes dans un milieu biologique.

### a) Recherche, identification et quantification en pratique courante d'une immunoglobuline monoclonale

La première étape sera une *électrophorèse* des protéines sériques (ou protéinogramme) avec détermination des protéines totales et des pourcentages des différentes fractions (*fig. 1*). Elle est réalisée à partir d'un prélèvement sérique (tube sec, sans activateur de la coagulation) chez le patient à jeun. La découverte à l'électrophorèse sérique d'une bande étroite (ou pic) située au niveau des bêta-2-globulines ou des gammaglobulines laisse supposer la présence d'une immunoglobuline monoclonale (*fig. 2A, 3A, 3C*). Son *identification* nécessitera impérativement un test complémentaire, qui sera soit :

- une immunoélectrophorèse ;
- une immunofixation (plus couramment pratiquée) (*fig. 1B*) ;
- une électrophorèse capillaire de zone après immunosoustraction (technique plus récente).

Dans le cadre de la maladie de Waldenström, l'identification de l'immunoglobuline monoclonale révèle une IgM kappa (75 % des cas) ou une IgM lambda (25 % des cas).
Enfin, la *quantification* de l'IgM monoclonale sera réalisée à partir de l'intégration du pic à l'électrophorèse des protéines sériques (ou densitométrie du pic). Cette quantification du constituant monoclonal sera utilisée pour le suivi de la maladie (avec ou sans traitement). L'électrophorèse sérique permet également d'apprécier une éventuelle diminution des autres immunoglobulines polyclonales résiduelles. Dans la maladie de Waldenström, il y a peu ou pas de diminution des autres classes d'immunoglobulines (contrairement au myélome).
Il est important de préciser que la quantification d'un constituant monoclonale par les techniques usuelles de dosage des protéines (néphélémétrie ou turbidimétrie) sont inexactes (souvent surestimées) en raison de la nature même du constituant monoclonal (IgM) et de son excès par rapport aux immunoglobulines normales (phénomène de zone). Dans la pratique, cela se traduit par des résultats très discordants selon les techniques utilisées. La méthode la plus exacte reste la densito-




A. Électrophorèse sérique anormale avec présence d'un artéfact entre la zone des β- et γ-globulines.
B. Immunofixation sérique réalisée sur le sérum sans traitement par un agent réducteur. Présence d'un artefact au niveau de toutes les pistes de migration (T, G, A, M, κ et λ)
C. Électrophorèse sérique réalisée après traitement du sérum par un agent réducteur (β-mercapto-éthanol). Présence d'un léger pic (évalué à 4 g/L) situé au niveau des γ-globulines.
D. Immunofixation sérique réalisée sur le sérum après traitement par un agent réducteur. Mise en évidence d'une IgM monoclonale à chaînes légères kappa, non décelée sur l'immunofixation standard (B).

**Figure 3.** Étude des protéines sériques d'un sérum humain pathologique

## c) Autres complications biologiques liées à l'IgM monoclonale

Elles s'observent généralement lorsque le taux d'IgM est élevé (> à 30 g/L). L'IgM monoclonale circulante (cryoprécipitante ou non) peut entraîner une *hyperviscosité*, une *hypervolémie plasmatique* (par le pouvoir oncotique élevé de l'IgM) et des *anomalies de l'hémostase*. Ces IgM ont en effet la capacité de s'agréger ou d'interagir avec d'autres constituants (globules rouges, plaquettes, par exemple). Ainsi, la *vitesse de sédimentation* est habituellement élevée et le frottis sanguin montre parfois des agrégats en chaînes de globules rouges appelés « rouleaux » (*fig. 4*).

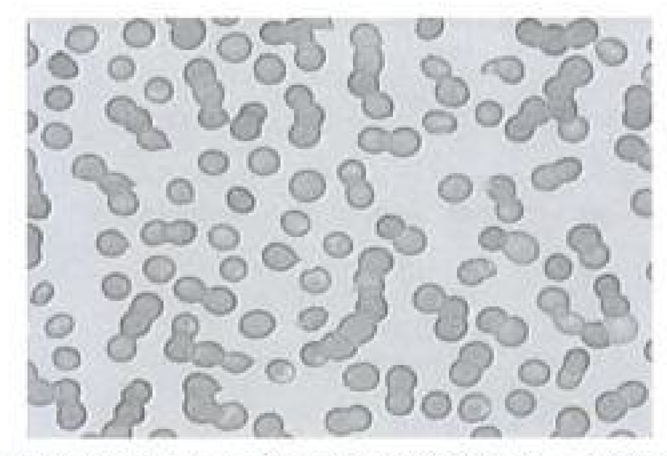


**Figure 4.** Frottis sanguins montrant la présence d'hématies en « chaînes » ou « rouleaux »

## B. Diagnostic formel

Le myélogramme ou la biopsie ostéomédullaire, en montrant un envahissement médullaire constitué de lymphoplasmocytes ou de lymphocytes, permettent d'établir le diagnostic.

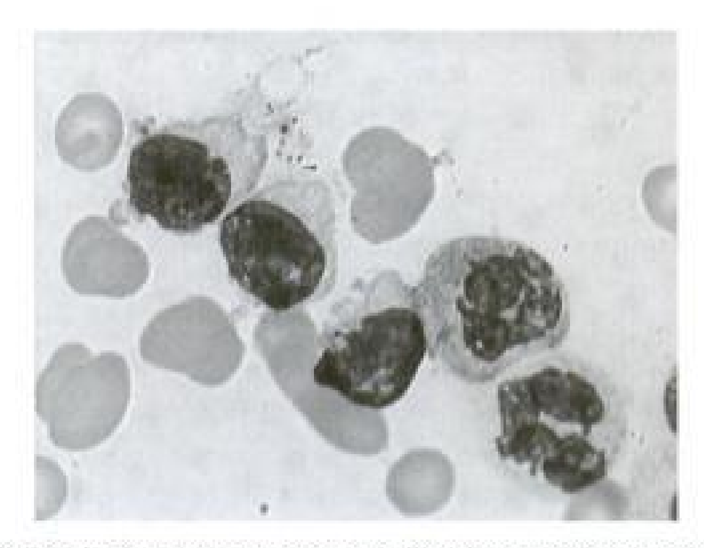


**Figure 6.** Frottis de moelle osseuse : infiltration lymphoplasmocytaire

L'immunophénotypage sur moelle (ou sang périphérique en cas de passage sanguin) ou l'immunomarquage sur la biopsie ostéomédullaire confirment le diagnostic. Ils montrent :

- une monotypie κ ou λ (expression d'une seule chaîne légère sur les lymphocytes ou lymphoplasmocytes) ;
- un CD5 et un CD23 négatifs (contrairement à la leucémie lymphoïde chronique) ;
- un CD10 négatif (contrairement au LNH folliculaire) ;
- un CD19 et un CD20 positifs (prolifération B).

L'électrophorèse et l'immunofixation révèlent un pic d'IgM monoclonale. En l'absence de pic, on parle de « lymphome lymphoplasmocytaire ».

## C. Diagnostics différentiels

- La *leucémie lymphoïde chronique* est caractérisée par une hyperlymphocytose. Elle s'associe souvent à des adénopathies et/ou une splénomégalie. Enfin, la présence d'un pic IgM monoclonal est fréquente (plus souvent que la présence d'un pic IgG ou d'un pic IgA). Le diagnostic est aisé, grâce à l'immunophénotypage lymphocytaire sur prélèvement sanguin.
- Les *lymphomes lymphoplasmocytaires* : le pic IgM est alors absent, la différence est plus sémantique que clinique car le pronostic et le traitement sont identiques.
- *Autres lymphomes* : cela concerne surtout les lymphomes de la zone marginale, souvent associés à un pic IgM.
- Les *gammapathies de signification indéterminée* : il n'y a pas d'adénopathie, pas d'envahissement médullaire, pas d'hyperviscosité. En revanche, une activité spécifique de l'anticorps est possible. Il s'agit d'un état prédisposant à la maladie de Waldenström.
- Le *myélome* : l'électrophorèse et l'immunofixation suffisent aisément à écarter le diagnostic. Le myélome à IGM est une entité exceptionnelle.

# V. Traitements

## A. Examens avant traitement

Avant tout traitement, un bilan d'extension initial est nécessaire afin de juger ultérieurement de l'efficacité de la thérapie. Ce bilan doit comprendre :
- une électrophorèse et une immunofixation des protéines sériques, une protéinurie des 24 heures (pouvant orienter vers une amylose lorsque la protéinurie est glomérulaire) ;
- une NFS à la recherche d'une anémie ou d'une thrombopénie ;
- un bilan d'hémostase (TP, TCA, temps de thrombine, fibrinogène) ;
- un scanner thoraco-abdomino-pelvien pour détecter d'éventuelles localisations profondes.

En cas de neuropathies, l'électromyogramme est nécessaire, ainsi que la ponction lombaire et la recherche d'anticorps antinerfs dans le sérum (anti-MAG, par exemple).

## B. Indications

La maladie de Waldenström est trop souvent traitée par excès, or le contexte clinique, l'état du patient, ses résultats biologiques et l'imagerie permettent d'orienter le clinicien. Les urgences sont rares, il est donc préférable d'attendre en cas de doute. Les critères généralement retenus pour traiter une maladie de Waldenström sont :
- une évolution rapide du pic monoclonal, sur quelques mois ;
- une complication (voir *supra*) ;
- un syndrome tumoral important ;
- une ou des cytopénies importantes.

## C. Traitements

Les traitements de référence sont le chloraminophène ou le cyclophosphamide *per os*, mais les analogues de purines (fludarabine et 2-CdA) *et*/ou le rituximab (anticorps anti-CD20) semblent plus efficaces. Enfin, l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques est en cours d'étude et semble prometteuse.
En cas d'hyperviscosité ou de neuropathie sévère, les plasmaphérèses peuvent être d'un précieux recours, mais elles ne servent qu'à passer un cap, un traitement de fond doit toujours leur être associé. En cas de résistance ou de rechute, les traitements suivent ceux des LNH agressifs. Le seul traitement curatif est l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Il s'agit d'une technique très lourde et toxique réservée aux patients les plus jeunes.

## L'essentiel de la question

La maladie de Waldenström est une hémopathie lymphoïde chronique classée par l'Organisation mondiale de la santé parmi les lymphomes lymphoplasmocytaires.
Elle se caractérise par un envahissement de la moelle osseuse par des lymphoplasmocytes et la présence d'une immunoglobuline M (IgM) monoclonale sérique.
La présence d'un syndrome tumoral est possible et la maladie peut souvent se compliquer de signes d'hyperviscosité (15 % des cas), les symptômes sont alors souvent proportionnels au taux d'IgM. Enfin, l'existence d'une neuropathie périphérique est fréquente (10 % des cas), l'IgM a alors souvent une activité anti-MAG.
La signature biologique de la maladie de Waldenström est l'excrétion d'une IgM monoclonale par un clone lymphocytaire B : IgM kappa (75 %) ou IgM lambda (25 %). La quantification de l'IgM monoclonale sera réalisée à partir de l'intégration du pic à l'électrophorèse des protéines sériques. Dans environ 10 % des cas, l'IgM monoclonale est cryoprécipitante. D'un point de vue biologique, cette IgM polymérisée et/ou cryoprécipitante sera à l'origine de nombreux artefacts dans les résultats des tests biologiques. La présence d'agglutinines froides est observée dans environ 15 % des cas.
Le diagnostic formel repose sur le myélogramme ou la biopsie ostéomédullaire. L'immunophénotypage sur moelle (ou sang périphérique en cas de passage sanguin) ou l'immunomarquage sur la biopsie ostéomédullaire confirment le diagnostic.
Les diagnostics différentiels se feront avec la leucémie lymphoïde chronique, les lymphomes lymphoplasmocytaires et les autres lymphomes, les gammapathies de signification indéterminée, le myélome.
Les critères pronostiques de la maladie de Waldenström sont mal établis (absence de consensus). L'évolution de la maladie est généralement indolente, il s'agit d'une maladie qui ne se guérit pas (sauf en cas d'allogreffe). La médiane de survie est supérieure à 5 ans.
Avant tout traitement, un bilan d'extension initial est nécessaire. Ce bilan doit comprendre une électrophorèse et une immunofixation des protéines sériques, une protéinurie des 24 heures, une NFS, un bilan d'hémostase, un scanner thoraco-abdomino-pelvien. La maladie de Waldenström est trop souvent traitée par excès, or le contexte clinique, l'état du patient, ses résultats biologiques et l'imagerie permettent d'orienter le clinicien. Les urgences sont rares. Les critères généralement retenus pour traiter une maladie de Waldenström sont une évolution rapide du pic monoclonal, sur quelques mois, une complication, un syndrome tumoral important, une cytopénie.
Les traitements de référence sont le chloraminophène ou le cyclophosphamide *per os*, toutefois les analogues de purines (fludarabine et 2-CdA) et/ou le rituximab (anticorps anti-CD20) semblent plus efficaces. Enfin, l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques est en cours d'étude et semble prometteuse. En cas d'hyperviscosité ou de neuropathie sévère, les plasmaphérèses peuvent être d'un précieux recours.
Le seul traitement curatif est l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Il s'agit d'une technique très lourde et toxique réservée aux patients les plus jeunes.

## *Pour en savoir plus*


- Immunoglobulines monoclonales, cahier de formation. Bioforma, 2003 : 28.
- Diviné M., Bierling P. *Macroglobulinémie de Waldenström.* L'hématologie de Bernard Dreyfus, Flammarion Médecine-Sciences, 1992, 997-1005.
- Choquet S. *Hématologie.* Ellipses, « Préparer l'internat », 2003.
- Fermand J.-P. Monographie consacrée aux gammapathies monoclonales. *Rev Prat.* 1993 ; 3 : 269-331.

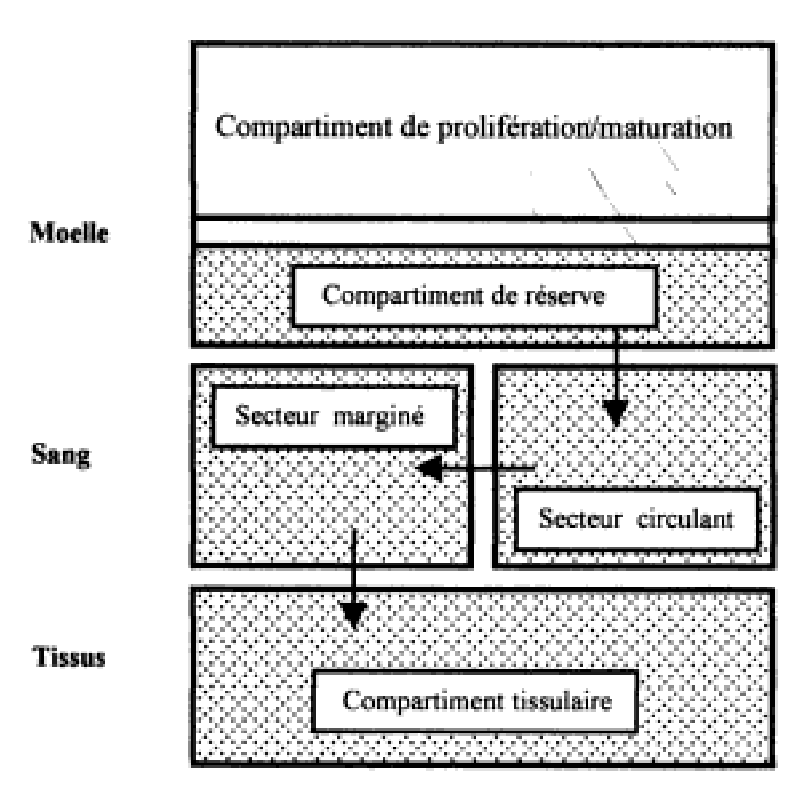



**Figure 1.** Répartition des polynucléaires neutrophiles dans les secteurs médullaire, sanguin, tissulaire, in *Hématologie clinique et biologique*, G. Sebahoun, 2005

### C. Fonctions du polynucléaire neutrophile

La fonction essentielle du polynucléaire neutrophile est de contribuer à *éliminer de l'organisme tout élément étranger* et d'empêcher le développement d'agents infectieux, essentiellement bactériens (surtout bactéries pyogènes). Ainsi, *à la base de la défense cellulaire* non spécifique, les PN doivent pouvoir intervenir rapidement et en nombre suffisant pour manifester efficacement leur *activité bactéricide*.

## II. Physiopathologie des neutropénies

On peut distinguer :

- les neutropénies centrales, par défaut de la granulopoïèse lié à :
  - une *insuffisance quantitative de production* avec hypoplasie granuleuse médullaire isolée ou entrant dans le cadre d'une aplasie médullaire totale. L'insuffisance de la granulopoïèse peut être liée à une anomalie de la CFU-GM ou à un inhibiteur,
  - une *granulopoïèse inefficace* avec mort intramédullaire des précurseurs du secteur prolifératif ;
- les neutropénies périphériques avec diminution de la durée de vie des polynucléaires neutrophiles :
  - soit par *destruction exagérée* des PN circulants (présence d'allo- ou d'auto-anticorps),

### 2. Neutropénies chroniques idiopathiques

- Parfois profondes chez l'adulte, liées à un trouble de la production médullaire.
- Modérées et stables chez des sujets anxieux ou dépressifs (surtout chez les femmes), ou en cas de margination excessive (pseudo-neutropénie).

## B. Neutropénies en cas d'hémopathie

Celles-ci s'accompagnent habituellement de thrombopénie et/ou d'anémie, la neutropénie pouvant être prédominante. Il en est ainsi pour les hémopathies, avec :
- hypoplasies-aplasies médullaires ;
- hypersplénisme par augmentation de la séquestration et destruction macrophagique ;
- carences vitaminiques (vitamine $B_{12}$, folates) ;
- envahissement médullaire (par des cellules leucémiques, lymphomateuses, métastatiques).

## C. Neutropénies, épiphénomènes d'une pathologie extramédullaire

### 1. Neutropénies et infections

De nombreuses infections peuvent se compliquer de neutropénie selon un mécanisme central et/ou périphérique :
- infections virales : neutropénie modérée et transitoire au cours de la plupart des infections virales aiguës, pouvant se prolonger en cas d'infection au VIH ;
- infections bactériennes : type brucellose et fièvre typhoïde ;
- infections parasitaires : au cours d'une fièvre prolongée en cas de leishmaniose ou de paludisme.

### 2. Neutropénies des affections endocriniennes

Neutropénie modérée en cas d'insuffisance thyroïdienne, surrénalienne ou d'hyperthyroïdie.

### 3. Neutropénies des collagénoses

Secondaires, elles sont de type auto-immun avec des anticorps ayant pour cible fréquente un récepteur des polynucléaires neutrophiles (le FCgRIII). On les observe en cas de lupus et de syndrome de Felty (SF).

## D. Cas particulier des neutropénies de l'enfant

Chez l'enfant en fonction des données cliniques et de l'âge, on distingue les formes *acquises* et les formes *congénitales*.

## 1. Neutropénies acquises

Outre les étiologies précédentes (infectieuses, médicamenteuses, etc.), il est possible d'envisager, selon l'âge :

- une neutropénie *néonatale* par allo-immunisation fœto-maternelle, due à un allo-Ac d'origine maternelle dirigé contre un antigène de groupe granulocytaire (NA1, NA2) transmis par le père. Elle se corrige en deux mois ;
- une neutropénie *auto-immune* de l'enfant vers l'âge de 8 mois : forme sévère en relation avec la présence d'auto-Ac antigranulocytes, guérissant habituellement de façon spontanée vers l'âge de 4 ans.

**Tableau 1.** Principaux médicaments responsables de neutropénie et mécanisme supposé de leur toxicité, selon Donadieu J., Encycl Med Chir (Elsevier, Paris), Hématologie, 1999

| Médicaments | Mécanisme supposé |
|---|---|
| **Cytostatiques** | |
| Tous, à l'exception de l'asparaginase et de la bléomycine | T |
| **Antibiotiques et antiviraux** | |
| Pénicillines et céphalosporines | I |
| Phénicolés | T |
| Sulfamides | I/T |
| Zidovudine | T |
| Ganciclovir | T |
| Aciclovir | T |
| Lévamisole | I |
| Pyriméthamine | T |
| **Tranquillisants** | |
| Chlorpromazine | T |
| Phénothiazines | T |
| **Anticonvulsivants** | |
| Phénytoïne | I |
| Carbamazépine | T |
| **Antithyroïdiens** | |
| Propylthiouracil | T |
| **Médicaments cardiovasculaires** | |
| Hydralazine | I |
| Procaïnamide | I |
| Quinidine | I |
| **Antirhumatismaux et antalgiques** | |
| Sels d'or | T |
| AINS (phénylbutazone, etc.) | I/T |
| Colchicine | T |
| Amidopyrine | I |
| D-pénicillamine | T |
| Indométacine | T |

I : mécanisme immunologique ; T : mécanisme toxique ; AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens.

*Les syndromes mononucléosiques sont une forme particulière d'hyperlymphocytose sanguine, qui se caractérise par la présence sur le frottis sanguin de grands lymphocytes hyperbasophiles. La majorité des syndromes mononucléosiques sont d'origine virale et l'identification de l'agent responsable repose sur des examens sérologiques. Le plus fréquent de ces syndromes est la mononucléose infectieuse, forme sévère de la primo-infection par le virus d'Epstein-Barr (EBV).*

# I. Diagnostiquer un syndrome mononucléosique

Le diagnostic de syndrome mononucléosique repose principalement sur les données de l'hémogramme. Le taux de globules blancs est toujours augmenté avec une hyperleucocytose variant de 10 à 20 G/L. Les formes leucopéniantes sont rares. La formule leucocytaire montre une prédominance de lymphocytes (50 à 80 %) ainsi qu'une neutropénie fréquente généralement modérée. Une discrète monocytose est habituelle. Le frottis sanguin montre des lymphocytes normaux, des lymphocytes polymorphes atypiques de taille variable (15-20 µm) ayant un cytoplasme bleuté parfois plus basophile en périphérie, agranulaire, et un noyau très souvent nucléolé. La basophilie du cytoplasme est le reflet d'une activité de synthèse augmentée. Des cellules de type lymphoplasmocytaire ou plasmocytaire peuvent être retrouvées. Le pourcentage de ces cellules hyperbasophiles est très variable d'un patient à un autre.

# II. Mononucléose infectieuse (MNI)

## A. Épidémiologie

Elle représente 85 % des syndromes mononucléosiques et se rencontre principalement chez l'adolescent et l'adulte jeune jusqu'à 25 ans. Elle est rare chez les adultes de plus de 30 ans. L'infection par le virus de l'EBV est très souvent inapparente, 80 à 90 % des sujets de plus de 15 ans ont des anticorps anti-EBV. Elle est cependant très fréquente chez l'enfant et généralement asymptomatique. Elle est retardée à l'adolescence dans les pays de haut niveau socio-économique.

## B. Physiopathologie

L'EBV est un virus à ADN appartenant à la famille des herpèsvirus. Il infecte les cellules épithéliales et préférentiellement les lymphocytes B. Deux types de virus ont été identifiés chez l'homme :

- l'EBV de type 1, plus fréquent en Amérique et en Europe,
- l'EBV de type 2, présent en Afrique.

La transmission de l'EBV se fait par la salive (maladie du baiser) et la période d'incubation dure entre quatre et six semaines. Le virus infecte les lymphocytes B directement ou après avoir traversé les cellules épithéliales amygdaliennes par inte-

ractions entre les glycoprotéines d'enveloppe virale et le CD21. Les lymphocytes B infectés sont activés, ils prolifèrent et produisent des virus qui infectent ainsi d'autres lymphocytes. L'infection entraîne une réponse immune qui fait intervenir les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) CD8+. Les cellules infectées non éliminées se différencient en cellules B mémoires et persistent dans la circulation.

## C. Diagnostic

### 1. Signes cliniques

La symptomatologie classique est définie par la triade suivante :
- fièvre accompagnée de malaises, asthénie, myalgies, courbatures ;
- pharyngite avec angine le plus souvent érythémateuse ;
- adénopathies à prédominance cervicale, bilatérale et splénomégalie dans la majorité des cas (70 %).

Il peut exister d'autres signes inconstants mais évocateurs comme le rash cutané, l'hépatomégalie avec subictère, la conjonctivite unilatérale, les céphalées, des diarrhées, des arthralgies.

### 2. Hémogramme

Il montre un syndrome mononucléosique typique avec la présence des cellules hyperbasophiles (30 à 40 %). La lignée érythroïde est généralement normale sauf dans les rares cas d'anémie hémolytique auto-immune (0,5 % des cas). Le taux de plaquettes est normal ou modérément diminué dans la moitié des cas.

### 3. Sérologies virales

Le diagnostic positif repose sur la recherche d'anticorps hétérophiles à l'aide du MNI test et la réaction de Paul-Bunnel-Davidsohn si le MNI test est positif. Ces deux examens recherchent des anticorps hétérophiles qui sont des IgM ayant la propriété d'agglutiner les hématies hétérologues (mouton, cheval et bœuf) et présents lors de l'infection à l'EBV. Chez le jeune enfant, ces anticorps n'apparaissent pas, nécessitant la recherche d'anticorps anti-EBV.

*Le MNI-test* réalisé sur le plasma du prélèvement de l'hémogramme est un test de dépistage rapide et très sensible. Il consiste en l'agglutination sur lame d'hématies de cheval ou de bœuf par le plasma du malade. S'il est positif, il est nécessaire de contrôler par la réaction de Paul-Bunnel-Davidsohn. S'il est négatif, c'est une mononucléose infectieuse séronégative. Il faudra alors une confirmation par la présence d'IgM anti-EBV. Son efficacité est cependant limitée par l'existence de faux négatifs (environ 10 %).

*La réaction de Paul-Bunnel-Davidsohn* dont la positivité confirme le diagnostic de MNI typique : chez le sujet normal, il existe des agglutinines de type Forssman qui peuvent agglutiner les globules rouges de mouton, de cheval ou de bœuf et qui sont neutralisés par l'extrait de rein ou de cobaye. Les anticorps de la MNI peuvent agglutiner les globules rouges de mouton, de cheval ou de bœuf mais les agglutinines ne peuvent absorber une émulsion de rein ou de cobaye. Elle consiste en

## C. Autres étiologies

Le syndrome mononucléosique n'est ni constant ni spécifique de ces affections. Il peut subvenir au cours de :

- viroses diverses : hépatites virales (surtout A), rubéole (syndrome mononucléosique particulièrement riche en plasmocytes), zona, varicelle, rougeole, oreillons ;
- infections bactériennes : rickettsiose, brucellose, typhoïde, syphilis secondaire ;
- paludisme en phase aiguë ;
- réactions immunitaires : médicamenteuses (pénicilline, hydantoïnes), greffes, maladies auto-immunes (LED), sorties d'aplasies postchimiothérapie.

# IV. Diagnostic différentiel

Le contexte clinique, l'aspect morphologique des lymphocytes et l'âge du patient sont essentiels dans l'affirmation du diagnostic.

*Les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) :* le tableau clinique comportant fièvre, asthénie, infections ORL, adénopathies et splénomégalie chez l'enfant est évocateur d'une LAL. Le diagnostic se fait à l'aide du frottis sanguin par le polymorphisme des lymphocytes qui s'oppose au monomorphisme et à l'immaturité des blastes présents dans les LAL de l'enfant.

*Les hyperlymphocytoses aiguës infectieuses* de l'enfant comme la maladie de Carl-Smith ou la coqueluche. La leucocytose est très souvent élevée et les lymphocytes sont matures.

*La leucémie lymphoïde chronique (LLC) et la maladie de Waldenström* chez l'adulte sont éliminées devant le tableau clinique, l'âge du patient et l'aspect morphologique des lymphocytes.

*Les lymphomes non hodgkiniens (LMNH) :* folliculaires, du manteau, prolymphocytaires. Les lymphocytes ont dans ce cas un aspect monomorphe.

## L'essentiel de la question

Les syndromes mononucléosiques sont une forme paticulière d'hyperlymphocytose sanguine caractérisée par la présence sur le frottis sanguin de grands lymphocytes hyperbasophiles. Ils s'observent dans des pathologies diverses : viroses, parasitoses, infections bactériennes, réactions immunitaires. Le plus fréquent de ces syndromes est la mononucléose infectieuse causée par le virus d'Epstein-Barr (EBV), qui affecte principalement les adolescents et les jeunes adultes.

***Pour en savoir plus***

- Sebahoun G. Les syndromes mononucléosiques. Hématologie clinique et biologique. Arnette.
- Raphaël M., Baran-Marszak F., Besson C. Syndromes mononucléosiques et pathologies hématologiques liés au virus d'Epstein-Barr. Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris) 2005 : 207-19.

# Thrombopénies

V. SIGURET, Service d'hématologie biologique, Groupe hospitalier Charles Foix – Jean Rostand (AP-HP), Ivry-sur-Seine.
A. STEPANIAN, Service d'hématologie biologique, immunologie et transfusion, Hôpital Louis Mourier (AP-HP), Colombes.

   - *maladie de Jean Bernard et Jean-Pierre Soulier* (transmission autosomique récessive) : il s'agit d'une thrombopathie liée à un déficit en complexe glycoprotéique Ib-IX de la membrane plaquettaire, associée à une thrombopénie modérée et à des plaquettes géantes. Le syndrome hémorragique est majeur ;
- *thrombopénies familiales* (transmission autosomique dominante) : elles sont peu ou pas du tout symptomatiques. Il s'agit de thrombopénies centrales chroniques de 10 à 80 giga/L sans autres anomalies associées. L'aspect des plaquettes est normal sur les frottis sanguins. La durée de vie des plaquettes est normale. Sur le myélogramme, les mégacaryocytes sont en nombre normal, mais la thrombocytopoïèse est inefficace.

# III. Thrombopénies périphériques

La thrombopénie est alors liée soit à un trouble de répartition des plaquettes, soit à une consommation ou à une destruction excessive des plaquettes en périphérie se traduisant par une durée de vie très raccourcie des plaquettes (quelques heures). En cas de consommation et/ou destruction des plaquettes, la production médullaire est normale, voire augmentée, par un mécanisme de compensation. Le myélogramme n'est réalisé en pratique qu'en l'absence d'étiologie évidente.

## A. Troubles de répartition

### 1. Hypersplénisme

Quelle que soit la cause de la splénomégalie, il existe alors une séquestration anormale des plaquettes dans la rate à l'origine d'une thrombopénie modérée (entre 80 et 150 giga/L), associée ou non à une anémie et/ou une leucopénie modérée.

### 2. Dilution

Une thrombopénie peut apparaître lors de transfusions massives de culots globulaires et/ou de solutés de remplissage. La grossesse est une autre cause d'hémodilution : le chiffre de plaquettes est considéré comme normal dans ce cas lorsqu'il est supérieur à 120 giga/L.

## B. Consommation excessive

### 1. Coagulation intravasculaire disséminée (CIVD)

C'est une situation fréquente qui relève parfois de l'urgence à l'hôpital. Les CIVD peuvent être de cause médicale (cancers métastasés, infections, brûlures étendues), obstétricale (rétention d'œuf mort, hématome rétroplacentaire, embolie

amniotique...), ou chirurgicale (chirurgie de la prostate, pulmonaire). La thrombopénie est alors associée :

- à une consommation des facteurs de la coagulation se traduisant par une chute brutale du taux de fibrinogène, du taux de prothrombine avec diminution des facteurs II, VII, X et surtout du facteur V, d'un allongement du TCA avec diminution du facteur VIII ;
- à la présence de produits de dégradation de la fibrine dans la circulation (D-Dimères, produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine ou PDF) ;
- à la présence de schizocytes sur le frottis sanguin.

Le traitement est celui de la cause de la CIVD.

### 2. Septicémies, paludisme

En dehors du mécanisme par CIVD.
Une thrombopénie sévère peut être observée lors d'accès palustre grave.

### 3. Échanges plasmatiques, circulation extracorporelle

Une thrombopénie est fréquente, liée à l'activation plaquettaire au niveau des circuits lors de chirurgie pulmonaire et/ou cardiaque, prothèses cardiaques, etc.

### 4. Syndrome de Moschcowitz ou syndrome hémolytique et urémique de l'enfant

Il s'agit d'une microangiopathie. La thrombopénie est inférieure à 50 giga/L, associée à une anémie hémolytique. Sur le plan clinique, la fièvre, l'existence de signes neurologiques et d'une insuffisance rénale sont des signes évocateurs.

### 5. Hémangiome géant

Il s'agit d'une malformation vasculaire rare entrainant une stase du sang au niveau cutané et la formation de microcaillots, d'où une consommation excessive des plaquettes.

## C. Destruction immunologique des plaquettes

La thrombopénie est liée à la destruction des plaquettes par des immuns complexes ou des anticorps dirigés contre certains antigènes plaquettaires.

### 1. Causes virales

Les virus induisent l'apparition de néo-antigènes à la surface de la membrane plaquettaire, ce qui peut être à l'origine de la formation d'anticorps antiplaquettes. Chez l'enfant, les virus en cause sont ceux de la rougeole, de la rubéole, de la varicelle, etc. Chez l'adulte, il s'agit plutôt des virus HIV, d'Epstein-Barr (MNI), du cytomégalovirus, des virus de l'hépatite B ou C, de l'herpès, du parvovirus.

### 2. Thrombopénies immuno-allergiques médicamenteuses

L'apparition d'anticorps antiplaquettes implique la sensibilisation préalable par un médicament, puisqu'il s'agit d'un phénomène immuno-allergique. La connais-

sance de la chronologie des événements est primordiale. Lors d'un premier contact avec un médicament, la thrombopénie peut survenir au bout d'une dizaine de jours d'une administration répétée. Parfois, le contact préalable avec le médicament est ancien et oublié et lors d'un contact ultérieur avec ce médicament, la thrombopénie peut alors être brutale et sévère. Il est donc important d'effectuer une numération des plaquettes avant de débuter tout traitement par un médicament pouvant induire une thrombopénie. Il convient de se méfier de l'automédication. Un élément de preuve *a posteriori* est la normalisation du chiffre de plaquettes six à huit jours après arrêt du médicament. Les médicaments en cause sont cités dans le *tableau*. En cas de suspicion de thrombopénie médicamenteuse, il faut arrêter immédiatement le médicament suspecté. Le Centre de pharmacovigilance doit être prévenu en cas de forte présomption.

Un cas particulier est celui des thrombopénies induites par l'héparine (TIH), fréquentes en milieu hospitalier, quel que soit le type d'héparine utilisé. Elles surviennent le plus souvent entre le cinquième et le vingt et unième jour du traitement. Le diagnostic biologique repose sur la recherche d'anticorps dirigés contre des complexes héparine-facteur 4 plaquettaire (PF4) et sur des tests fonctionnels d'agrégation plaquettaire. Sur le plan clinique, elles se traduisent par des thromboses veineuses et/ou artérielles, qui peuvent menacer le pronostic vital. En cas de suspicion de TIH, l'arrêt de l'héparine s'impose. Deux molécules antithrombotiques ont désormais une indication dans les TIH : la lépirudine – Refludan®, hirudine recombinante –, et le danaparoïde (Orgaran®), héparinoïde.

**Tableau 1.** Principaux médicaments responsables de thrombopénies

| Principaux médicaments commercialisés en France, très probablement responsables de thrombopénies (par ordre de niveau de preuve décroissant) | Principaux médicaments commercialisés en France, probablement responsables de thrombopénies (par ordre de niveau de preuve décroissant) |
|---|---|
| Quinidine | Sels d'or |
| Quinine | Carbamazépine |
| Rifampicine | Hydrochlorothiazide |
| Triméthoprime-sulfaméthoxazole | Ranitidine |
| Méthyldopa | Chlorpropamide |
| Digoxine | Sulindac |
| Danazol | Ibuprofène |
| Diclofénac | Phénytoïne |
| Aminoglutéthimide | Oxytétracycline |
| Amphotéricine B | Glibenclamide |
| Oxprenolol | Fluconazole |
| Vancomycine | Captopril |
| Lévamisole | Ampicilline |
| Amiodarone | |
| Acide nalidixique | |
| Cimétidine | |
| Chlorthiazide | |
| Interféron α | |
| Sulfasalazine | |
| Éthambutol | |
| Sulfisoxazole | |

## 6. Purpura thrombopénique idiopathique (PTI)

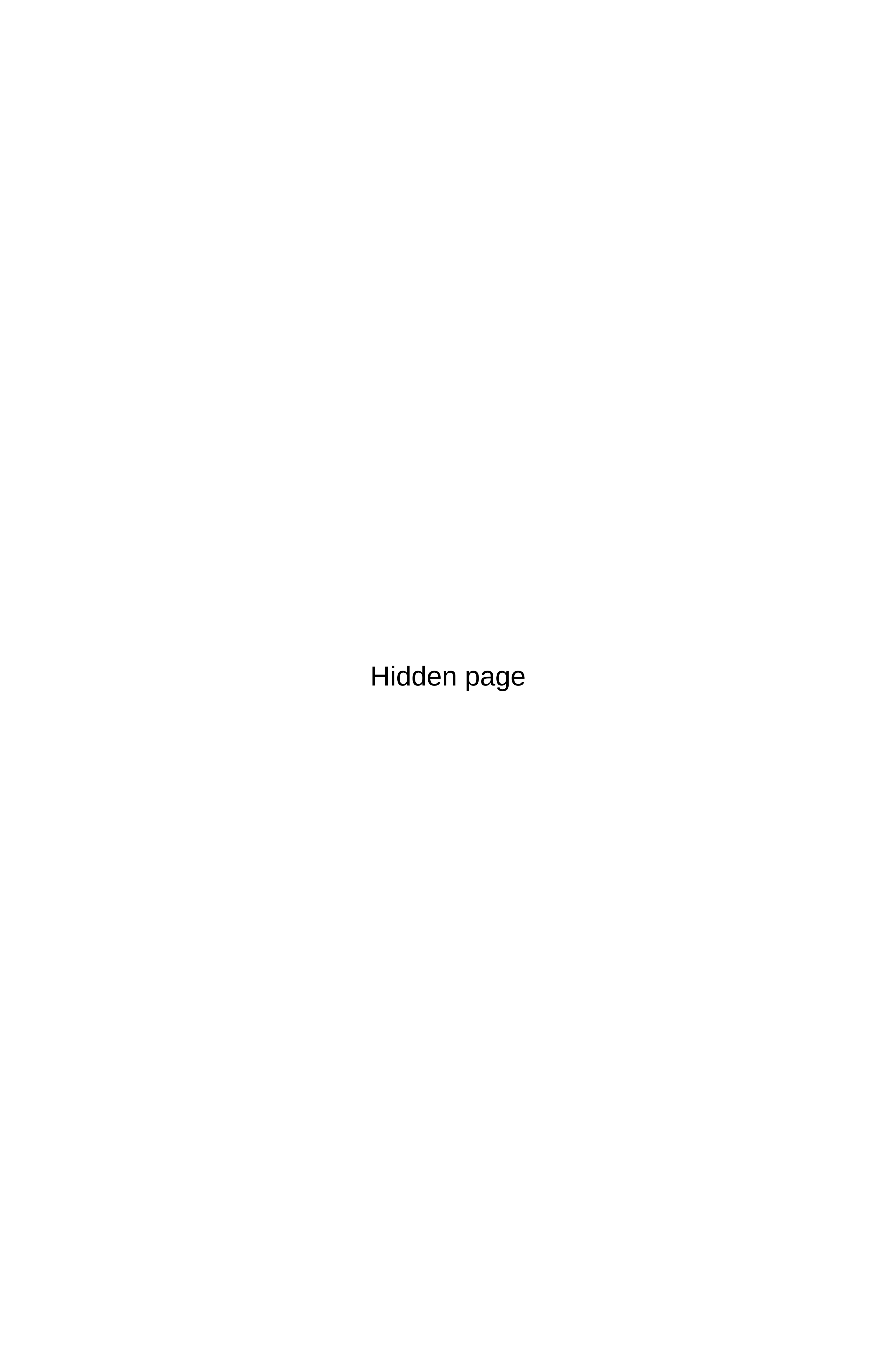
C'est une affection hématologique bénigne et rare dont l'incidence est estimée entre 1/10 000 et 1/100 000, mais pouvant entraîner la mort par hémorragie dans 3 ou 4 % des cas. Le diagnostic de PTI demeure un diagnostic d'exclusion, difficile. Sa physiopathologie reste mal connue. Chez l'enfant, le purpura est aigu avec souvent la notion d'infection rhinopharyngée récente. Chez l'adulte, on le rencontre plus fréquemment chez les femmes que chez les hommes. Le PTI de la femme enceinte (plaquettes < 80 giga/L) demande une prise en charge particulière étant donné les risques d'atteinte fœtale (voir *supra*).

### a) Clinique du PTI en phase aiguë

- Purpura : pétéchies, ecchymoses.
- Bulles buccales, épistaxis.
- Hémorragies rétiniennes.
- Hémorragies de section.
- Hémorragies des viscères : digestives, hématuries, utérines.
- Hémorragies cérébro-méningées : elles mettent en jeu le pronostic vital.

### b) Biologie du PTI

- La NFS montre une thrombopénie sévère (plaquettes entre 5 et 20 giga/L) dans la phase aiguë du PTI. Une anémie est possible, liée aux hémorragies.
- Les tests de coagulation sont normaux (TP, TCA, fibrinogène). Il n'y a pas de signes de CIVD.
- Le *myélogramme*, dont l'intérêt pratique est consensuel uniquement dans les cas suivants :
  - chez l'enfant avant toute corticothérapie : il est en effet important d'éliminer une leucémie, aiguë notamment ;
  - existence d'atypies à l'hémogramme ou à l'examen clinique (splénomégalie ou adénopathie) ;
  - sujet de plus de 60 ans ;
  - absence de réponse aux traitements de première ligne. En présence d'un PTI, le myélogramme est normal avec des mégacaryocytes nombreux (++++) le plus souvent au stade basophile, et morphologiquement normaux.
- *Tests immunologiques plaquettaires* : ces examens sont réalisés dans des laboratoires très spécialisés. Certains examens sont difficiles à réaliser quand la thrombopénie est sévère :
  - détection et quantification d'immunoglobulines associées aux plaquettes du patient : *Coombs plaquettaire direct* (positif dans 60 % des cas de PTI seulement). Cet examen permet de mettre en évidence des anticorps fixés sur les plaquettes du patient et de les quantifier à l'aide d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux marqués (le test de Dixon, variante du premier, a été peu à peu abandonné au profit du Coombs direct) ;
  - détection d'anticorps antiplaquettes dans le sérum du malade : *Coombs plaquettaire indirect* ;
  - détermination de la *spécificité des anticorps* fixés sur les plaquettes du patient après élution de ceux-ci. Ils permettent de mettre en évidence les cibles de la


Hidden page

l'enfant et de l'adulte (VIH notamment), allo-immunisation fœto-maternelle ou post-transfusionnelle, apparition d'auto-anticorps dans diverses pathologies auto-immunes : lupus érythémateux disséminé, complications immunes des syndromes lympho-prolifératifs, purpura thrombopénique idiopathique (PTI). Le traitement de la thrombopénie est celui de la cause. Dans le cas du PTI, les corticoïdes et/ou les immunoglobulines à forte dose sont proposés en première intention.

***Pour en savoir plus***

- Sebahoun G. « Purpuras » in *Hématologie clinique et biologique*. Arnette (2e éd.), Paris, 2005 : 173-9.
- Sebahoun G. « Purpura thrombopénique auto-immun » in *Hématologie clinique et biologique*. Arnette (2e éd.), Paris, 2005 : 181-7.
- Delobel J. Thrombopénies (à l'exception des purpuras thrombopéniques idiopathiques et des purpuras thrombotiques thrombocytopéniques). Encycl Med Chir (Elsevier, Paris), Hématologie, 13-020-B-10, 1997 : 7.
- Godeau B, Bierling P. Purpura thrombopénique auto-immun. Encycl Med Chir (Elsevier, Paris), Hématologie, 13-020-C-10, 1997 : 8.
- Rapport d'élaboration de référentiel d'évaluation des pratiques professionnelles : purpura thombopénique auto-immun. ANAES, décembre 2004.
- Recommandations pour la transfusion de plaquettes : produits, indications. AFSSAPS, juin 2003.

# Hémostase

*Le « complexe prothrombinique » est un terme ancien définissant l'ensemble des facteurs de la coagulation impliqués dans la voie du facteur tissulaire et explorés par le temps de Quick : les facteurs II, V, VII et X. Nous avons délibérément choisi de traiter l'allongement du temps de Quick dans sa globalité, en y ajoutant les anomalies du fibrinogène et les anticoagulants circulants, bien que ne faisant pas partie sticto sensu du complexe prothrombinique. La plupart des anomalies rencontrées sont des déficits combinés acquis, secondaires à un défaut de production ou à un excès de consommation. Il existe de rares cas de déficits isolés d'origine constitutionnelle ou résultant de la présence d'anticorps.*

# I. Anomalies de la coagulation d'origine hépatique

Ces anomalies sont des anomalies acquises et se rencontrent très fréquemment en pratique quotidienne d'hémostase. En effet, l'hépatocyte est le site de synthèse de la plupart des facteurs de la coagulation, mais également de ses inhibiteurs. Plusieurs facteurs sont généralement en cause et le risque hémorragique dépend du taux de facteurs résiduels fonctionnels.

## A. Insuffisances hépatocellulaires

Toute insuffisance hépatique sévère ou modérée peut être en cause : hépatites virales aiguës ou chroniques, cirrhoses, hépatites cytolytiques, etc. En revanche, un défaut d'absorption de la vitamine K (voir *infra*) se produit au cours de la cholestase. Il est toutefois admis que le processus même de carboxylation des facteurs est anormal au cours des insuffisances hépatiques. Le défaut de synthèse touche l'ensemble des protéines de la coagulation, à l'exception du facteur VIII et du facteur Willebrand, mais également les protéines de la fibrinolyse et leurs inhibiteurs respectifs. L'insuffisance hépatocellulaire est par ailleurs un processus complexe au cours duquel peut se greffer un syndrome de consommation. Dans certaines circonstances, il existe des anomalies des fonctions plaquettaires associées à une thrombopénie par séquestration splénique ou par défaut de synthèse de la thrombopoïétine.
Le diagnostic biologique d'une insuffisance hépatocellulaire est évoqué devant un allongement du temps de Quick associé à un allongement du temps de céphaline activé, une diminution du taux du fibrinogène et de l'ensemble des facteurs II, V, X et VII. Le risque hémorragique est majoré si le taux de ces facteurs est inférieur à 30 %.

## B. Déficits en vitamine K

Les facteurs II, VII, IX et X (ainsi que les protéines C et S) subissent une carboxylation hépatique sur leurs résidus glutamiques amino-terminaux, sous l'action d'une carboxylase dont la vitamine K est le cofacteur. Cette carboxylation est indispensable à la liaison des facteurs sur les membranes phospholipidiques en présence d'ions calcium. En l'absence de vitamine K, des facteurs inactifs circulent et un risque hémorragique directement lié au taux de facteurs actifs résiduels existe.

Les déficits en vitamine K sont associés soit à une carence d'apport (nutritionnelle, alimentation parentérale), soit à un défaut d'absorption (cholestase, diarrhées chroniques), soit à une immaturité hépatique (nouveau-né). Certains antibiotiques peuvent être à l'origine d'un déficit en facteurs vitamine K, dépendants par destruction de la flore microbienne productrice de vitamine K ou par action directe sur le cycle de régénération hépatique de ladite vitamine (latamoxef). Un syndrome hémorragique majeur peut survenir en cas de surdosage par les anticoagulants oraux antivitamine K ou lors d'une intoxication par un raticide (dérivé coumarinique). Le diagnostic est envisagé lors d'un déficit en facteurs II, VII et X alors que le facteur V et le fibrinogène sont normaux (*fig. 1*). Le traitement consiste en l'administration de vitamine K1 *per os* ou par voie intraveineuse. En cas de syndrome hémorragique, on associera une perfusion de concentré en facteurs vitamine K dépendants, le PPSB (Kaskadil®).

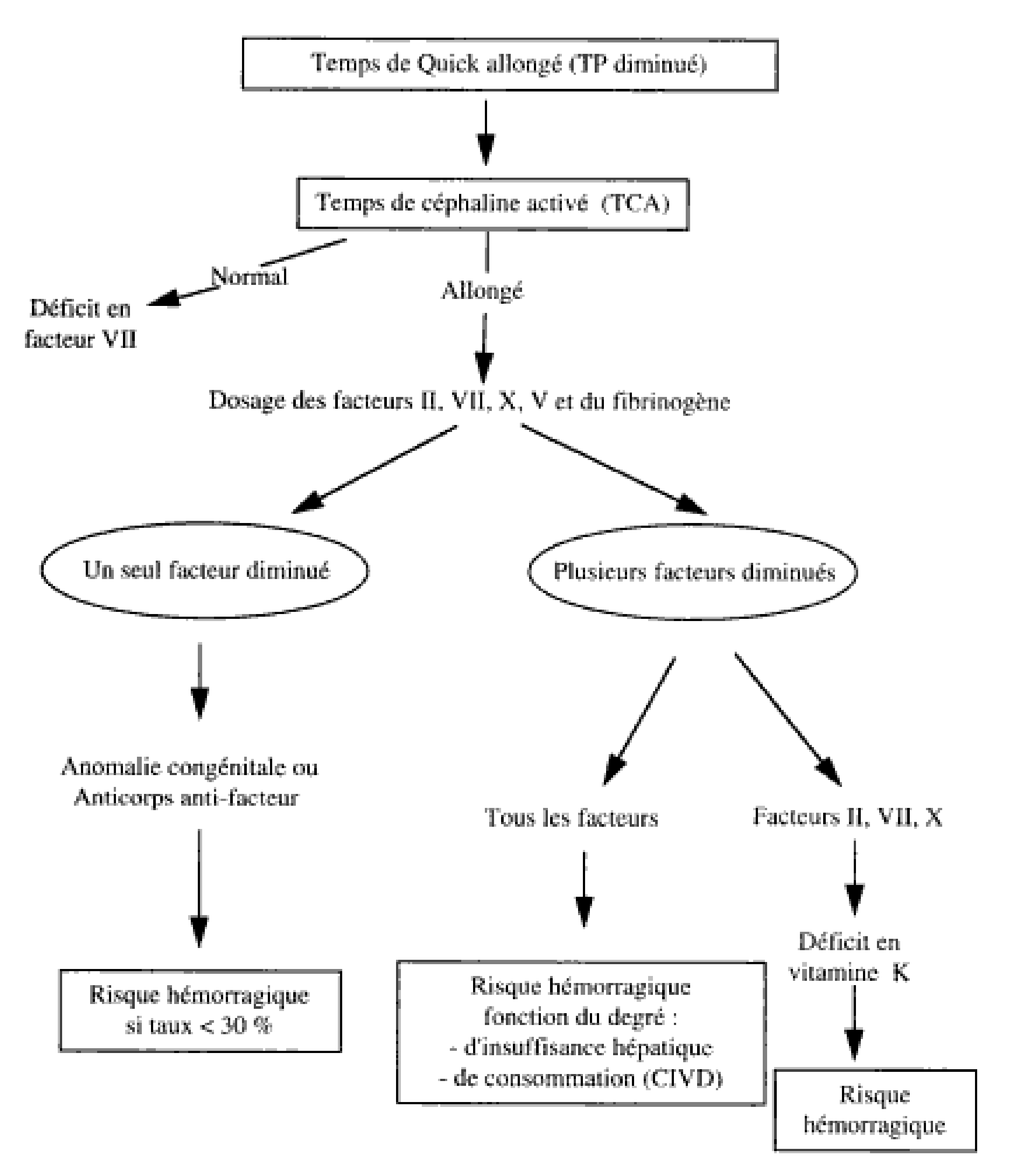



**Figure 1.** Démarche diagnostique devant un allongement du temps de Quick

cas, des concentrés de fibrinogène (Clottagen®), d'antithrombine (Aclotine®) ou de protéine C peuvent être administrés. En revanche, le PPSB (Kaskadil®) est à proscrire car il contient des traces de facteurs activés. En cas de composante thrombotique majoritaire, elle peut être jugulée par l'administration de faibles doses d'héparine.

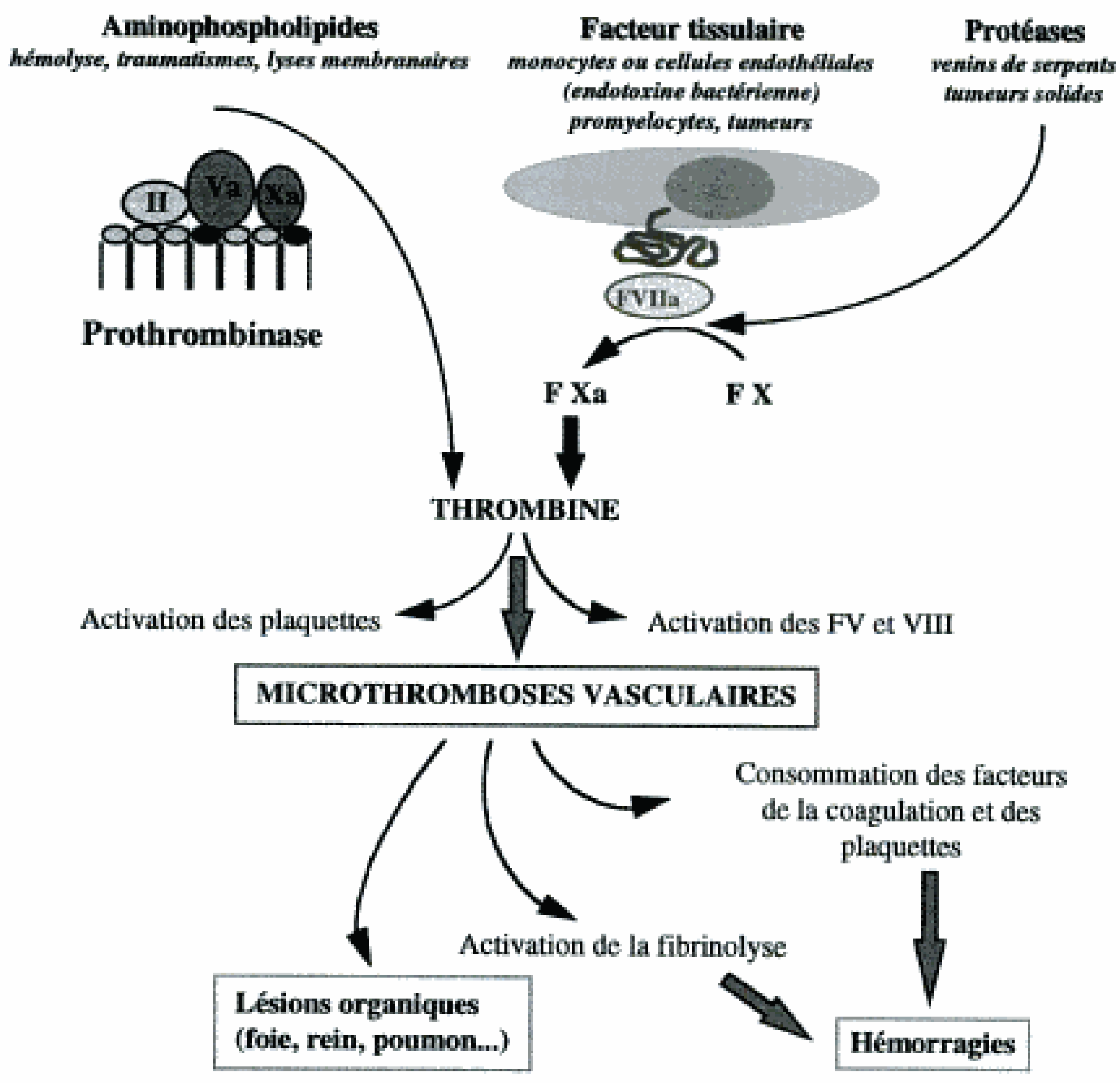



**Figure 2.** Physiopathologie de la coagulation intravasculaire disséminée

**Tableau 1.** Principales étiologies des coagulopathies de consommation

| | |
|---|---|
| *Obstétricales* | Embolies amniotiques<br>Ruptures utérines<br>Rétentions de fœtus mort<br>Infections, avortements septiques<br>Hématomes rétroplacentaires<br>Placentas praevias<br>Éclampsies, etc. |
| *Chirurgicales* | Chirurgies portocaves, circulations extracorporelles<br>Transplantations<br>Polytraumatismes |
| *Médicales* | Septicémies : surtout bactéries gram négatif, mais également gram positif, virus, parasites, rickettsies, etc.<br>Brûlures étendues<br>Hémolyses massives : erreurs de transfusion<br>Cancers disséminés et leucémies aiguës promyélocytaires<br>Morsures de serpents |

Ils sont mis en évidence par la persistance de l'allongement du temps de coagulation lorsque le plasma du patient est incubé avec un plasma normal.
L'expression clinique varie. Dans certains cas, elle est identique à celle du déficit en facteur en cause avec un syndrome hémorragique corrélé au taux de facteur résiduel. Un certain nombre de sujets restent toutefois asymptomatiques.
Le traitement change selon la pathologie sous-jacente, mais fait généralement appel à l'immunosuppression et à la plasmaphérèse en cas d'urgence.

## B. Anticoagulants de type lupique

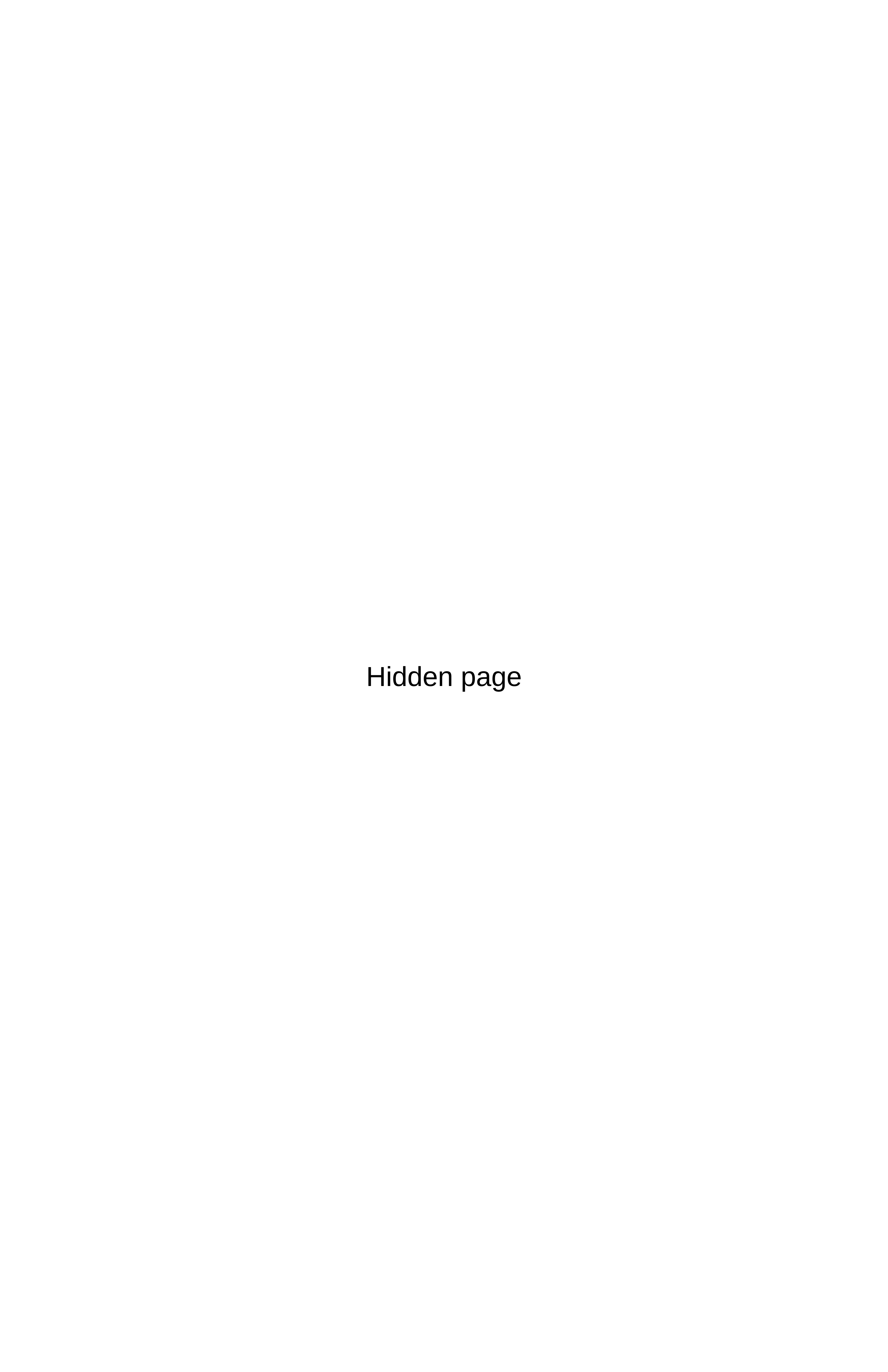
Il s'agit d'anticoagulants circulants interférant avec *les phospholipides anioniques* indispensables à la coagulation. En général, le temps de Quick est peu modifié. Le temps de céphaline activé est généralement allongé et non corrigé par l'ajout de plasma normal. La confirmation de leur présence peut être apportée par des tests spécifiques mettant en évidence la neutralisation des phospholipides. Une recherche d'anticardiolipines est associée (recherche du syndrome des antiphospholipides). Ces anticorps dirigés contre les phospholipides ne sont jamais responsables de syndromes hémorragiques. À l'inverse, ils sont impliqués dans la survenue de pathologies thrombotique artérielle ou veineuse et notamment au cours de maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux disséminé.

# L'essentiel de la question

Les anomalies de la coagulation explorées par le temps de Quick sont résumées dans la *figure 1*. Dans la grande majorité des cas, il s'agit d'anomalies acquises, touchant de façon concomitante plusieurs facteurs. Il convient de disposer d'un panel d'examens biologiques simples afin de différencier un syndrome de consommation aigu – pour lequel le diagnostic est un acte d'urgence –, d'un défaut de production par insuffisance hépatocellulaire ou carence en vitamine K. Un déficit isolé en facteur doit faire rechercher une anomalie congénitale ou la présence d'un anticoagulant circulant. Dans tous les cas, c'est le diagnostic biologique de l'anomalie et la présentation clinique qui conduiront à une thérapeutique appropriée.

***Pour en savoir plus***


- Sampol J., Arnoux D., Boutière B. *Manuel d'hémostase*. Paris, Elsevier, « Option Bio », 1995.
- Gouault-Heilmann M. *Aide-mémoire d'hémostase*. Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 1999.
- Levi M., Ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation. *New Engl J Med* 1999 ; 341 : 586-92.


Hidden page

coagulation mesuré en secondes est reporté sur une courbe d'étalonnage établie à l'aide d'un plasma titré.
Valeurs usuelles des FIIC, FVC, FVIIC et FXC : 70 à 130 %.
Les déficits isolés ou combinés en chacun de ces facteurs exposent le patient à un risque hémorragique variable selon la sévérité du déficit et le type de facteur.

## 2. Mesure de l'activité coagulante des facteurs FVIII, FIX, FXI ou FXII (facteurs dits « de la voie endogène »)

Le principe est d'effectuer un TCA sur un mélange (volume à volume) du plasma dilué du malade (au 1/10 et au 1/20) et d'un plasma déficient en facteur à doser. Le temps de coagulation mesuré en secondes est reporté sur une courbe d'étalonnage établie à l'aide d'un plasma titré.
Valeurs usuelles : FVIIIC et FIXC, 50 à 150 % – FXIC et FXIIC, 60 à 140 %.
Les déficits isolés ou combinés en FVIII, FIX et FXI exposent le patient à un risque hémorragique variable selon la sévérité du déficit. En revanche, il n'y a pas de risque hémorragique lié au déficit isolé en FXII.

## 3. Bilan de coagulation intravasculaire disséminée

Le dosage semi-quantitatif des D-dimères ou des PDF complète le bilan minimum constitué par le taux de prothrombine, le taux de fibrinogène et la numération plaquettaire.

## 4. Recherche d'un anticoagulant circulant

En cas de suspicion d'un anticoagulant circulant devant un allongement du TCA non corrigé, il conviendra, selon le contexte clinique, de distinguer les anticoagulants lupiques phospholipodépendants des antifacteurs à l'aide d'examens spécifiques spécialisés.
Parmi les anticorps antifacteurs, les anticorps antifacteur VIII acquis chez des sujets non hémophiles sont à l'origine de graves syndromes hémorragiques et définissent l'hémophilie acquise : ils peuvent survenir en *post-partum*, chez les sujets âgés, ou sont secondaires à une pathologie auto-immnune, un cancer, etc.

## 5. Bilan de thrombose

En cas d'antécédents thrombotiques personnels et/ou familiaux révélés à l'interrogatoire, un bilan biologique à la recherche d'anomalies biologiques prédisposant à la thrombose peut être prescrit.
Il n'existe pas d'examen global explorant le risque thrombotique. Il faudra rechercher les différents facteurs de risque à l'aide d'examens spécifiques : dosage d'antithrombine, protéine C, protéine S, résistance à la protéine C activée, mutation Leiden du facteur V, mutation G20210A du gène de la prothrombine, etc.

## 6. Enquête familiale

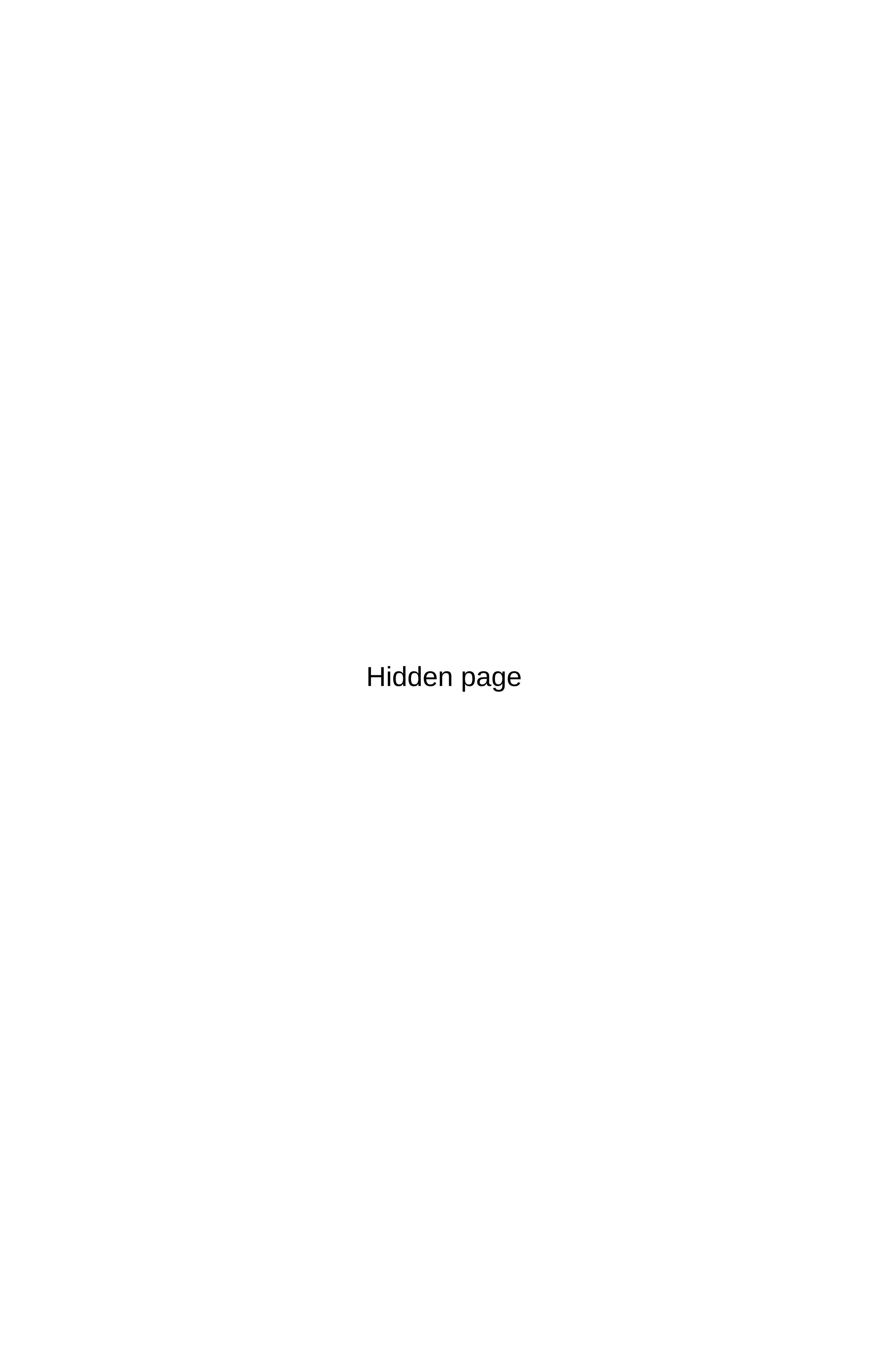
En cas de suspicion d'anomalie congénitale de l'hémostase, une enquête familiale peut être envisagée.

## L'essentiel de la question

Le bilan d'hémostase pré-opératoire a pour but de dépister chez un patient une anomalie de l'hémostase primaire ou de la coagulation entraînant un risque hémorragique. Ce bilan comprend en premier lieu un interrogatoire rigoureux incluant l'historique médicamenteux. Les examens à effecteur sont l'hémogramme incluant la numération plaquettaire, un temps de saignement ou un temps d'occlusion plaquettaire (à discuter en fonction du contexte), ainsi que plusieurs tests de coagulation plasmatique : un temps de Quick (exploration de la voie du facteur tissulaire, exprimé en pourcentage d'activité), un temps de céphaline plus activateur (exploration de la voie des facteurs contacts), un temps de thrombine (exploration de la fibrinoformation) ou un dosage du fibrinogène. La découverte d'une anomalie de l'un ou plusieurs de ces tests sera complétée à l'aide d'examens d'hémostase plus spécialisés selon une démarche diagnostique précise.

# Surveillance d'un traitement anticoagulant

F. DOUTREMÉPUICH, Laboratoire d'hématologie, UFR de pharmacie, Bordeaux.



# I. Médicaments agissant par l'intermédiaire d'un cofacteur

## A. Héparine non fractionnée

L'héparine est une substance anticoagulante découverte par Jay Mac Lean en 1916. Sa structure chimique a été précisée en 1918 par William Henry Howell, mais ce n'est qu'en 1936 qu'elle est utilisée pour la première fois comme anticoagulant en clinique humaine.

L'héparine est un mélange de glycosaminoglycanes très hétérogènes, extraits de façon industrielle du poumon de bœuf ou de l'intestin du porc. Elle est constituée de chaînes de polysaccharides, de masses moléculaires comprises entre 3 000 et 35 000 daltons. Ces chaînes sont riches en groupement sulfate et carboxyle. La plus petite séquence qui possède un effet anticoagulant correspond à un pentasaccharide de masse moléculaire d'environ 2 500 daltons.

Les molécules d'héparine sont constituées de deux types de fractions :

- des fractions à haute affinité pour l'ATIII, très actives sur la coagulation ;
- des fractions à faible affinité pour l'ATIII et moins actives sur la coagulation.

L'héparine standard possède de nombreuses propriétés mais la plus importante est l'activité anticoagulante, qui résulte de la liaison de l'héparine à l'ATIII par le site d'affinité pour celle-ci. Le complexe ainsi formé accélère l'inactivation de plusieurs enzymes, qui sont formées au cours de la coagulation et, notamment, la thrombine et le facteur Xa. Il en résulte un allongement du temps de coagulation.

L'héparine standard possède également une action sur les plaquettes et sur l'endothélium vasculaire. Elle augmente la perméabilité vasculaire, réduit la prolifération des cellules musculaires lisses et provoque la libération de l'activateur tissulaire de plasminogène (t-PA).

L'héparine ne peut pas être administrée par voie orale car elle ne traverse pas la barrière digestive. C'est pourquoi elle est administrée par voie sous-cutanée ou intraveineuse et est éliminée selon une combinaison de deux mécanismes :

- un mécanisme rapide et saturable qui correspond à la liaison de l'héparine à des récepteurs sur les cellules endothéliales et sur les macrophages ;
- un mécanisme lent et rénal.

À une dose thérapeutique, une proportion importante de l'héparine administrée est éliminée par le premier mécanisme. La demi-vie de l'héparine peut varier selon la quantité administrée : ainsi l'administration d'un bolus d'héparine par voie intraveineuse à la dose de 25 UI/kg apporte une demi-vie d'environ trente minutes. S'il est administré à ce même patient un bolus intraveineux de 100 UI/kg, la demi-vie biologique passe à soixante minutes. De même, la biodisponibilité de l'héparine est réduite après administration par voie sous-cutanée à faible dose, c'est-à-dire à 12 000 UI par injection toutes les douze heures. À des doses plus importantes, la biodisponibilité est presque totale.

## 1. Effets secondaires

De nombreuses complications peuvent résulter de l'héparinothérapie : la thrombopénie avec ou sans thrombose, l'ostéoporose et l'hémorragie qui est la complication majeure.

## 2. Surveillance d'un traitement à l'héparine

La surveillance biologique inclut un bilan préthérapeutique (voir « *Les héparines* »), le dosage de l'héparinémie, et les tests au laboratoire, comme le TCA ou le temps d'Howell et la numération plaquettaire.
L'efficacité de l'héparine est influencée par de nombreux facteurs dont les plus importants sont le nombre de plaquettes circulantes qui contiennent un facteur neutralisant l'héparine, le facteur plaquettaire 4 (Pf4).

## 3. Indications thérapeutiques

L'héparinothérapie est particulièrement indiquée dans les traitements préventifs et curatifs des thromboses veineuses, de l'embolie pulmonaire et lors des thromboses artérielles afin de limiter l'extension du thrombus.
Elle est également utilisée dans la maladie coronarienne, l'angor instable, et dans l'infarctus du myocarde en phase aiguë où elle réduit la fréquence des thromboses intracardiaques (*tab. 1*).

**Tableau 1.** Indications de l'héparinothérapie

| | |
|---|---|
| **Thrombose veineuse** | |
| Prophylaxie de la thrombose veineuse profonde et de l'embolie pulmonaire | 5 000 UI par voie sous-cutanée toutes les 8 heures, ou doses ajustées d'héparine |
| Traitement de la thrombose veineuse profonde | 5 000 UI en bolus intraveineux suivi de 32 0000 UI par 24 heures par voie intraveineuse, ou ajuster de façon à maintenir le temps de céphaline kaolin (TCK) en zone thérapeutique |
| **Maladies coronariennes** | |
| Angor instable ou infarctus du myocarde aigu sans traitement thrombolytique | 5 000 UI en bolus intraveineux suivi de 32 000 UI par 24 heures de façon à maintenir un TCK dans la zone thérapeutique |
| Infarctus aigu traité par un thrombolytique | 5 000 UI en bolus intraveineux suivi de 24 000 UI par 24 heures ajusté de manière à maintenir un TCK dans la zone thérapeutique |

## 4. Contre-indications

L'héparine est contre-indiquée en cas de réaction d'hypersensibilité à l'héparine, de maladie hémorragique constitutionnelle ou de risques hémorragiques importants.

## 5. Prophylaxie de la thrombose veineuse

L'héparine est utilisée à une dose fixe de 5 000 unités par voie sous-cutanée toutes les huit heures afin de prévenir la survenue d'une thrombose veineuse chez les patients médicaux et chirurgicaux.
Différentes analyses ont montré que les patients qui bénéficiaient d'une chirurgie générale et qui étaient traités par l'héparine avaient un risque de thrombose veineuse et d'embolie pulmonaire réduit d'environ 50 %. Le risque de thrombose est aussi réduit chez les patients bénéficiant d'une chirurgie orthopédique.

## A. Surveillance biologique

Le traitement par les AVK nécessite une surveillance biologique associant le TCA, le Taux de Prothrombine (TP), et l'INR (*International Normalized Ratio*) :

$$\text{INR} = \frac{(\text{temps patient})^{\text{ISI}}}{(\text{temps témoin})}$$

ISI = coefficient de sensibilité du réactif utilisé.

## B. Indications thérapeutiques

Les AVK anticoagulants oraux à long terme peuvent être utilisés en relais avec l'héparine ou associés aux antiagrégants plaquettaires. Ils sont indiqués chez les patients porteurs de prothèses valvulaires, dans l'insuffisance cardiaque et les maladies exposant à des thromboses comme la fibrillation auriculaire (*tab. 2*).

**Tableau 2.** Indications thérapeutiques des antivitamines K

| Indications | Inr |
|---|---|
| Prophylaxie de la thrombose veineuse (chirurgie à haut risque) | 2 – 3 |
| Traitement de la thrombose veineuse | 2 – 3 |
| Traitement de l'embolie pulmonaire | 2 – 3 |
| Prévention de l'embolie systémique :<br>valves cardiaques tissulaires,<br>valves cardiaques prosthétiques mécaniques,<br>infarctus aigu du myocarde,<br>maladies valvulaires cardiaques,<br>fibrillation auriculaire | 2 – 3 |
| Valves prosthétiques mécaniques (haut risque) | 2,5 – 3,5 |

## C. Contre-indications des AVK

Les contre-indications sont absolues en présence :
- d'une hypertension artérielle sévère ;
- d'un antécédent d'accident vasculaire cérébral hémorragique ;
- de varices œsophagiennes ;
- des premier et troisième trimestres de grossesse ;
- d'une insuffisance rénale ou hépatique sévères ;
- de troubles psychiatriques ;
- de syndromes hémorragiques.

Les contre-indications sont à discuter en présence de :
- chirurgie récente ;
- l'âge du patient.

# IV. Traitement de l'hémophilie, complications liées au traitement, bases du suivi biologique

Les hémophiles sont le plus souvent suivis dans des centres spécialisés. Tout hémophile doit porter sur lui un carnet précisant le type d'hémophilie dont il souffre, sa sévérité, etc.

## A. Traitement substitutif

### 1. Principes du traitement substitutif

Le traitement substitutif vise à corriger le trouble de la coagulation et consiste en la perfusion intraveineuse (IV) du facteur déficient : FVIII chez les hémophiles A ou FIX chez les hémophiles B.
Un traitement substitutif pourra être instauré dès lors qu'il existe un saignement nécessitant une correction de l'hémostase, en cas de chirurgie ou, enfin, en cas de traumatisme même sans signe clinique car les hémorragies présentent volontiers un caractère retardé. L'évolution dépend de la précocité de l'instauration du traitement. Le traitement d'un accident hémorragique doit, dans certains cas, s'accompagner de l'immobilisation de l'hémophile.
Les taux de FVIIIC recherchés après substitution sont fonction de la situation clinique. Dans les situations chirurgicales, ils dépendent du type de chirurgie. En cas d'accident hémorragique, ils dépendent de la sévérité de l'hémorragie : celles-ci sont classées en hémorragies mineures, graves, ou mettant en jeu le pronostic vital (traumatisme crânien, accident de la voie publique, chirurgie majeure, hémorragie digestive, etc.) (*tab. 1*).

**Tableau 1.** Taux de facteur recommandés en fonction du type d'hémorragie

| | Taux minimum de facteur recommandés | |
|---|---|---|
| | Hémophilie A FVIII | Hémophilie B FIX |
| Hémorragie mineure | 15 - 30 % | 20 - 40 % |
| Hémorragie grave | 30 - 50 % | 30 - 60 % |
| Hémorragie mettant en jeu le pronostic vital | 50 - 100 % | 80 - 100 % |

Les posologies seront ainsi calculées en fonction des taux de facteurs VIII ou IX recherchés :

- pour le FVIII : la perfusion de *1 UI/kg* augmente le taux circulant de FVIII de 2 % (par exemple, 20 UI/kg élèvent le taux de FVIII d'environ 40 %). Dans les concentrés de FVIII, la demi-vie du FVIII étant d'environ huit heures, trois perfusions par jour sont nécessaires ;

La posologie est de 0,3 µg/kg en IV lente immédiatement avant le geste chirurgical ou en cas d'accident hémorragique. L'administration peut être répétée toutes les douze heures. Voie IN : une pulvérisation pour un poids < 50 kg ou deux pulvérisations si ≥ 50 kg.
Précautions : hypertension artérielle, insuffisance coronarienne (réduire les posologies).
Effets indésirables : *intoxication par l'eau* avec hyponatrémie (imposer impérativement une restriction hydrique à 750 ml/jour), hypotension artérielle transitoire, céphalées, nausées, crampes abdominales, flush, tachycardie.

## C. Traitements associés

Ils sont la conséquence de la morbidité de la pathologie :
- antalgiques : paracétamol (l'aspirine est formellement contre-indiquée) ;
- corticothérapie lors d'accidents graves ;
- antifibrinolytiques lors d'hémorragies de la cavité buccale ou digestive (retardent la lyse du caillot fragile) ;
- immobilisation en cas d'hémarthroses, associée à la kinésithérapie ;
- chirurgie : prothèses.

## D. Thérapie génique : l'avenir ?

La thérapie génique consiste à introduire un matériel génétique étranger dans une cellule (c'est-à-dire une transfection) à des visées thérapeutiques. Dans les cas des hémophilies A et B, cela consiste à remplacer et/ou à corriger le défaut moléculaire portant sur le gène du FVIII ou du FIX. Les vecteurs étudiés sont essentiellement des virus (adénovirus, rétrovirus, lentivirus). En pratique, les virus sont déplétés de leur virulence. Le gène d'intérêt y est introduit et le patient est infecté par ce virus. Quelques méthodes physiques de transfection ont été étudiées sans succès (injection directe du gène, encapsulation du gène dans des liposomes, transfert grâce à des récepteurs). Théoriquement, il existe deux approches :
- méthode *ex vivo :* des cellules isolées à partir du patient sont transfectées *in vitro* (un gène étranger y est introduit grâce à un vecteur), puis lui sont réinjectées. Cette méthode permet une bonne maîtrise des conditions de transfection et évite d'injecter des virus au patient ;
- méthode *in vivo :* elle a l'avantage d'éliminer les problèmes liés à la réimplantation des cellules chez le patient (infections, cellules modifiées *in vitro*), mais nécessite l'injection d'un vecteur contenant le matériel génétique dans la circulation sanguine ou à proximité du tissu cible (foie).

L'hémophilie sévère est une bonne cible potentielle pour la thérapie génique, puisqu'un seul gène est mis en cause : un simple défaut induit des taux effondrés, qu'il suffirait de remonter de très peu pour changer de façon spectaculaire la vie du patient (deux patients ayant des taux respectifs de 1 et 2 % ont deux maladies *totalement* différentes : hémophilies sévère et modérée !). Les essais cliniques chez l'homme concernent quelques cas non suffisants pour juger l'efficacité ou la toxicité du système. La thérapie génique suscite d'énormes intérêts.

# V. Aspects génétiques

## A. Diagnostic des conductrices

### 1. Enquête génétique

Elle est primordiale et comprend l'établissement d'un arbre généalogique le plus étendu possible. Il fait apparaître deux types de conductrices :
- les conductrices obligatoires (portant un chromosome X anormal) :
  - filles d'hémophile,
  - femmes ayant au moins deux enfants hémophiles,
  - femmes ayant un enfant hémophile avec des antécédents familiaux d'hémophilie ;
- les conductrices potentielles :
  - sœurs d'hémophile (probabilité de 50 %),
  - filles de conductrices obligatoires (probabilité de 50 %),
  - cousines germaines d'hémophile (probabilité de 12,5 %), etc.

### 2. Étude du phénotype

Jusqu'aux progrès de la génétique, le diagnostic des conductrices était uniquement fondé sur l'étude du phénotype des conductrices potentielles :
- pour l'hémophilie A, par détermination du rapport FVIII:C/VWF:Ag : si ce rapport était inférieur à 0,6 ou 0,7, le diagnostic était en faveur du statut de conductrice. Un tiers seulement des conductrices d'hémophilie A présentent un taux de FVIII:C compris entre 15 et 50 %. Cependant, de grandes variations inhérentes aux méthodes de dosage, à la période du cycle menstruel lors du prélèvement et enfin à l'inactivation aléatoire du chromosome X (lyonisation) existent chez les femmes. Cette méthode ne permet donc pas de porter un diagnostic dans la moitié des cas et, dans tous les cas, le résultat est rendu avec une probabilité calculée ;
- pour l'hémophilie B, par détermination du rapport FIX:C-FIX:Ag : ce diagnostic est fondé sur le même principe que le précédant, avec les mêmes limites.

### 3. Étude du génotype

Elle permet d'apporter un diagnostic de certitude. L'existence de néomutations, la possibilité de mosaïcisme et les questions de paternité restent toujours à considérer. Deux stratégies sont possibles.

#### a) Analyse directe par identification de l'anomalie moléculaire responsable de l'hémophilie chez la conductrice potentielle

Cette stratégie, appliquée à une famille donnée, suppose que l'anomalie soit identifiée dans cette famille chez un cas index. C'est cette stratégie qui est désormais suivie dans les pays occidentaux. Elle peut cependant être longue et complexe car

il existe une grande variété de défauts moléculaires à l'origine de l'hémophilie et les gènes codant le FVIII et le FIX sont de grande taille : 186 kilobases (kb) pour le gène du FVIII et 34 kb pour le gène du FIX.
L'*hémophilie A* : dans environ 40 % des cas, l'hémophilie A sévère est liée à une même *micro-inversion* d'un segment télomérique du chromosome X interrompant le gène du FVIII, par recombinaison de séquences homologues, dont l'une est située dans l'*intron* 22 du gène du FVIII (*figure*). À rechercher en première intention dans l'hémophilie A sévère.

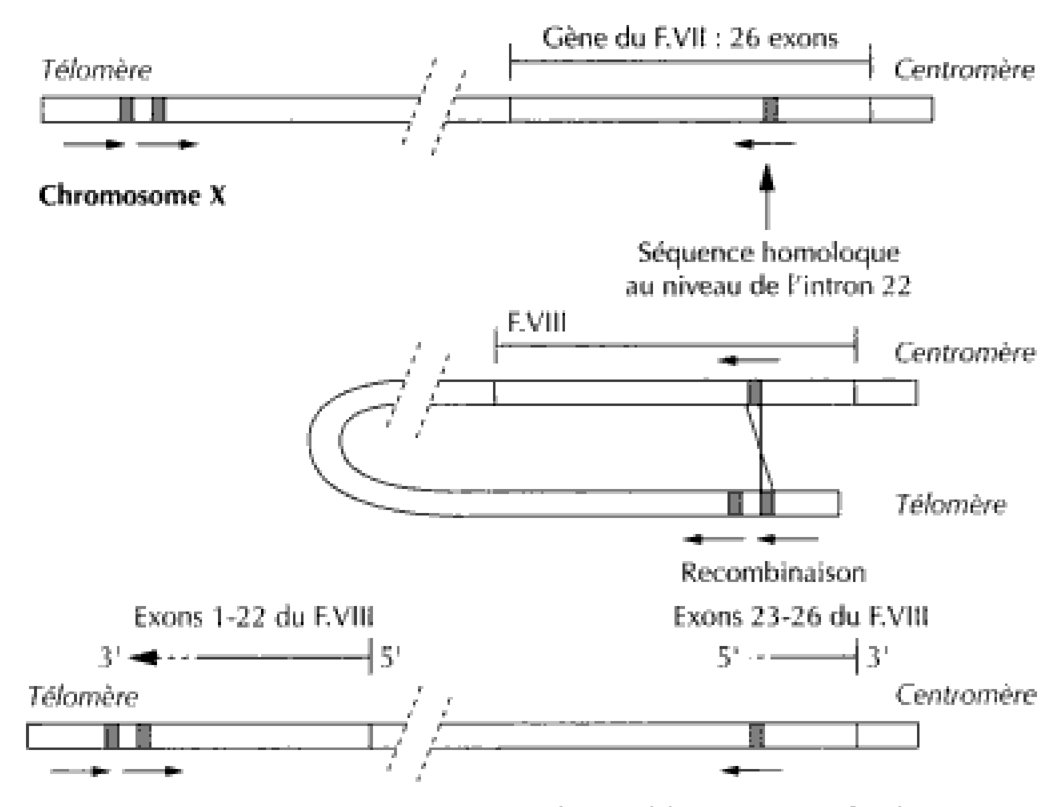


**Figure 1.** Micro-inversion dans l'intron 22 du gène du FVIII

*Autres cas* : la stratégie est complexe du fait de l'hétérogénéité des anomalies. Cinq pour cent des formes sévères de l'hémophilie A sont liées à une délétion, 45 % environ à une mutation ponctuelle : mutations non-sens (codons STOP), mutations responsables de décalage de phase de lecture, anomalies d'épissage, innombrables mutations faux-sens… Les formes modérées et atténuées sont le plus souvent liées à des mutations faux-sens.
L'*hémophilie B* : identification de mutations ponctuelles dans la majorité des cas, délétions, insertions, etc.

### b) Analyse indirecte par étude des polymorphismes de longueur de fragments de restriction ou RFLP

Cette stratégie est réservée aux cas pour lesquels l'anomalie moléculaire reste inconnue. Dans une affection héréditaire, le principe de l'analyse indirecte est de trouver, dans chaque famille, un polymorphisme intragénique, de préférence, ou extragénique situé le plus près possible du gène en cause, marqueur permettant de reconnaître le chromosome portant le gène délétère et de suivre la manière dont il ségrège dans la famille étudiée. L'anomalie moléculaire reste, dans ce cas, ignorée.

Le traitement substitutif standard comprend deux types de produits : les dérivés plasmatiques et les molécules recombinantes. Les complications liées au traitement sont essentiellement immunologiques : après une ou plusieurs substitutions, 15 à 30 % des hémophiles A sévères et seulement 3 à 5 % des hémophiles B sévères développent un anticorps dirigé contre le facteur perfusé (anticoagulant circulant anti-FVIII ou anti-FIX) encore appelé « inhibiteur ». Dans les formes modérées, il est également possible d'utiliser la DDAVP.
Le diagnostic des conductrices d'hémophilie fait appel à une enquête génétique et à une étude du génotype par l'analyse directe du gène ou par RFLP. Dans l'hémophilie A sévère, environ 40 % des cas sont liés à une même micro-inversion dans l'intron 22 du gène du FVIII, qui est donc à rechercher en première intention.

### *Pour en savoir plus*

- GREHCO (Groupe de recherche et d'études de l'hémophilie du Centre et de l'Ouest). *Le traitement de l'hémophilie*. Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 2002.
- C. Négrier. « Hémophilies A et B » in *Hémorragies et thromboses*. Paris, Masson, 2004.

# Maladie de Willebrand

V. DESPLAT, Laboratoire d'hématologie, Faculté de pharmacie, Bordeaux-II.

*Décrite en 1926 par Erik von Willebrand, la maladie de Willebrand est la plus fréquente des pathologies héréditaires hémorragiques (prévalence mondiale supérieure à 1 %). Son mode de transmission est autosomique, le plus souvent dominant. Elle est liée à une anomalie quantitative ou qualitative d'un facteur de coagulation, le facteur de Willebrand (vWF, von Willebrand factor). Cette protéine a deux fonctions dans l'hémostase : d'une part, elle permet l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium lésé et leur agrégation et, d'autre part, elle assure le transport et la protection du facteur VIII dans le plasma. L'anomalie porte donc sur l'hémostase primaire et sur la coagulation.*
*Cette maladie est hétérogène dans son expression clinique, phénotypique et génotypique. Il existe plusieurs principaux groupes de déficits en facteur Willebrand : soit un déficit quantitatif partiel (type 1) ou total (type 3), soit un déficit qualitatif regroupant de nombreux sous-types (variants de type 2). La caractérisation précise des différents types est indispensable pour déterminer la prise en charge thérapeutique.*

# I. Facteur de Willebrand

Le gène du vWF, localisé sur le bras court du chromosome 12, est un très grand gène de 180 kD contenant 52 exons et présentant un grand polymorphisme. Il est exprimé uniquement dans les cellules endothéliales et les mégacaryocytes. Le facteur de vWF est tout d'abord synthétisé sous la forme d'un précurseur de 2 813 aa qui après clivage du peptide signal donne naissance au provWF. Le vWF mature est une glycoprotéine constituée de multimères de 500 à 20 000 kDa formés par l'association de sous-unités identiques de 270 kD. Il est stocké dans les granules α (alpha) des plaquettes et dans les grains de Weibel-Palade des cellules endothéliales. Il est sécrété dans le plasma et le sous-endothélium vasculaire.
Le vWF a deux fonctions essentielles. La première, dans l'hémostase primaire où il permet l'adhésion et l'agrégation plaquettaire en établissant un pont entre les structures sous-endothéliales lésées et les glycoprotéines de la membrane plaquettaire. La seconde, dans la coagulation où il assure le transport du facteur VIII (facteur antihémophilique A) dans le sang circulant au site de la lésion vasculaire. En se liant au facteur VIII, il le protège d'une dégradation enzymatique augmentant ainsi sa durée de vie dans le plasma.

# II. Génétique

La maladie de Willebrand est une maladie héréditaire dont la transmission est autosomale. Elle est le plus souvent dominante et les patients ont 50 % de risque de transmettre la maladie à leurs enfants (types 1 et 2). Chez les patients atteints de la forme sévère (type 3), la transmission se fait selon le mode récessif. La transmission paraît également récessive chez certains variants moléculaires.

# III. Classification

Trois grands types de maladie de Willebrand sont reconnus.

## A. Type 1

Il se caractérise par un déficit quantitatif partiel en vWF. Il représente 70 à 80 % des patients atteints de maladie de Willebrand. Il est de transmission autosomale dominante.

## B. Type 2

Il se caractérise par une anomalie qualitative du vWF. Il représente 15 à 20 % des cas et comporte de nombreux variants ou sous-types. Il est de transmission autosomale dominante, sauf pour certains sous-types où elle est autosomale récessive. Il existe quatre grands variants moléculaires qui sont dus soit à une anomalie d'interaction du vWF avec les plaquettes (sous-types 2A, 2B, 2M) soit à une anomalie d'interaction du vWF avec le facteur VIII (sous-type 2N) :

- *le sous-type* 2A représente 10 % de tous les types de maladie de Willebrand et 75 % des variants de type 2. Il se caractérise par une diminution de l'affinité du vWF pour les plaquettes, liée à l'absence de multimères de haut poids moléculaires et est de transmission dominante ;
- *le sous-type 2B* présente une augmentation de l'affinité du vWF pour la GPIb (agrégation plaquettaire en présence de faibles doses de ristocétine), une liaison spontanée des multimères de haut PM aux plaquettes *in vivo* (thrombopénie et multimères de haut PM absents du plasma). Il est à transmission dominante ;
- *le sous-type 2N (« N » pour « Normandie »)* montre une diminution de l'affinité du vWF pour le facteur VIII, une mutation au niveau du site de fixation du vWF et un déficit modéré en facteur VIII avec des taux de vWF normaux. Il est à transmission récessive ;
- *le sous-type 2M (« M » pour « multimères »)* affiche quant à lui une diminution de l'interaction du vWF avec les plaquettes mais distribution plasmatique des multimères normales.

## C. Type 3

Il se caractérise par un déficit quantitatif total en vWF et un taux de facteur VIII très diminué. C'est la forme la plus rare (1 à 5 % des cas) et la plus sévère. Elle est de transmission autosomale récessive.

# IV. Variations physiopathologiques

La concentration plasmatique normale du vWF est de l'ordre de 10 µg/ml (= 100 %) mais, d'un individu à un autre, elle peut varier de 40 à 240 %. Une aug-

mentation physiologique de ce taux peut apparaître dans différentes situations comme l'âge, le stress, l'exercice physique, la grossesse, un syndrome inflammatoire, rendant le diagnostic difficile dans les formes frustes de la maladie (type 1 et quelques types 2). Le diagnostic peut aussi être délicat chez les sujets de groupe sanguin O qui ont un taux de vWF 25 à 35 % plus faible que ceux des autres groupes.

## V. Manifestations cliniques

D'expression clinique très hétérogène, la maladie de Willebrand se caractérise principalement par des hémorragies muqueuses (épistaxis, gingivorragies, règles abondantes chez la femme, hémorragies gastro-intestinales) et cutanées (ecchymoses, saignements prolongés lors de coupures ou de plaies). Les manifestations cliniques sont spontanées ou provoquées par un traumatisme. Les saignements post-traumatiques ou chirurgicaux notamment lors d'extraction dentaire ou d'amygdalectomie sont particulièrement fréquents. La maladie de Willebrand de type 3 se manifeste par des accidents hémorragiques sévères dès la petite enfance. Elle ressemble à une maladie hémophilique avec apparition d'hématomes musculaires et parfois de saignements dans l'articulation (hémarthroses) lorsque l'enfant commence à se déplacer.
Chez les femmes avec une maladie de Willebrand modérée (type 1), les taux de facteur de Willebrand se normalisent fréquemment pendant la grossesse et au moment de l'accouchement. En revanche, dans le post-partum, les taux de vWF et de facteur VIII s'abaissent rapidement. Cette période nécessite une surveillance attentive dans les sept à dix jours après l'accouchement. Dans la forme grave et les variants moléculaires, les taux de vWF restent abaissés durant la grossesse.

## VI. Diagnostique biologique

Le diagnostic biologique fait appel à plusieurs niveaux de tests spécialisés qui permettent d'établir le phénotype biologique précis indispensable à la prise en charge thérapeutique. La diversité des examens et les antécédents familiaux du patient permettent d'affirmer le diagnostic.

### A. Tests de routine d'hémostase

- Numération des plaquettes : taux de plaquettes normal sauf dans le type 2B qui présente une thrombopénie d'importance variable.
- Temps de saignement (TS) allongé selon la méthode d'Ivy (mais parfois normal chez certains malades).
- Temps de céphaline activé (TCA) allongé (lors d'un déficit important en facteur VIII) ou normal.

• Temps de Quick, temps de thrombine et fibrinogène normaux.

Le temps d'occlusion réalisé par l'automate PFA100 (analyseur de la fonction plaquettaire) est anormal dans tous les types sauf le type 2N. Les tests de routine sont nécessaires mais insuffisants pour porter un diagnostic, il faut faire appel à des tests spécifiques.

## B. Tests spécifiques

- Dosage du facteur VIII (FVIII:C) : diminution des taux du facteur VIII variable en fonction du type mais nette dans les types 3 et 2N.
- Dosage de l'activité cofacteur de la ristocétine du vWF (vWF:Rco) : la ristocétine est un antibiotique qui permet l'interaction du vWF avec le GPIb. Diminution des taux de vWF:Rco dans tous les types. Critère de choix pour le diagnostic.
- Dosage immunologique du vWF (vWF:Ag) : diminution de l'antigène Willebrand.

## C. Tests discriminatifs

D'autres tests étudiant la structure et la fonction du vWF permettent de préciser le type et le sous-type de maladie de Willebrand. Ils sont réservés à des laboratoires spécialisés :

- étude de l'agrégation et de l'activité plaquettaire en présence de ristocétine : l'agrégation plaquettaire induite par la ristocétine (RIPA) dépend de la concentration de vWF et de l'affinité du vWF pour la GPIb (voir *tableau 1*) ;
- étude de la distribution des multimères du vWF : elle est déterminée par électrophorèse du plasma dans un gel d'agarose contenant un agent dissociant afin de séparer les multimères qui seront ensuite révélés par un anticorps spécifique (voir *tableau 1*) ;
- il existe également des tests très spécialisés étudiant la liaison du vWF aux plaquettes, au collagène ou au facteur VIII. L'analyse de l'ADN peut également être réalisée afin de mettre en évidence des mutations dans le gène *vWF*.

**Tableau 1.** Les différents sous-types de la maladie de Willebrand et leurs caractéristiques biologiques

| TESTS | Type 1 | Type 2A | Type 2B | Type 2M | Type 2N | Type 3 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| TS | allongé | allongé | allongé | allongé | normal | très allongé |
| F VIIIc | normal ou diminué | normal ou diminué | normal ou diminué | normal ou diminué | diminué | très diminué |
| vWF:Ag | diminué | diminué | diminué | diminué | normal | < 1 % |
| vWF:RCo | diminué | très diminué | très diminué | diminué | normal | < 1 % |
| (RIPA)* | normale ou diminuée | nulle ou très diminuée | augmentée | diminuée | normale | nulle |
| Multimères dans le plasma | normaux | absence des formes intermédiaires et de haut poids moléculaires | absence des formes de haut poids moléculaires | normaux | normaux | absents |

* Agrégation plaquettaire en présence de ristocétine.

# VIII. Traitement

Le but du traitement est de corriger les anomalies de l'hémostase primaire et de la coagulation soit pour arrêter l'hémorragie soit à titre préventif en cas d'intervention chirurgicale. Le traitement est différent en fonction du type et de la gravité de la maladie, de l'importance du saignement et du temps pendant lequel il sera nécessaire de corriger l'anomalie. Différentes méthodes doivent être utilisées et sont souvent suffisantes en fonction du lieu de saignement : compression locale, méchage résorbable d'un épistaxis, utilisation d'une colle biologique après avulsion dentaire, traitement hormonal en cas de ménorragies abondantes. Deux stratégies thérapeutiques sont actuellement possibles.

## A. DDAVP ou desmopressine (Minirin IV®)

Injecté par voie intraveineuse à une dose de 0,3 µg/kg, cet analogue synthétique de la vasopressine provoque la libération de facteur de Willebrand à partir des cellules endothéliales et de facteur VIII dans la circulation. Le patient doit synthétiser un certain taux de vWF qualitativement normal. Ainsi, ce traitement ne peut être utilisé dans les formes sévères de type 3. Son utilisation est variable chez les patients de type 2 en fonction du sous-type. Elle est rarement efficace pour les sous-types 2A et 2M. Elle est contre-indiquée dans le sous-type 2B. En effet, la DDAVP a tendance à provoquer une agrégation des plaquettes responsable d'une thrombopénie. La réponse est satisfaisante mais brève pour le sous-type 2N. Une étude de la réponse à la DDAVP doit être réalisée chez chaque patient lors du diagnostic ou une semaine avant la chirurgie afin de savoir si la correction de l'hémostase est satisfaisante. La DDAVP est généralement le traitement de choix pour les patients de type 1 et dits « bons répondeurs ». La réponse à la DDAVP est rapide mais transitoire. Les effets secondaires sont rares : rétention hydrique, vasodilatation modérée pouvant apparaître et se traduisant par un flush facial, une tachycardie ou des céphalées. Elle est contre-indiquée chez la femme enceinte ou en cours d'allaitement, chez l'enfant de moins de 2 ans et dans le cas d'une hypersensibilité à l'un des constituants. Ce médicament existe également en spray nasal utilisable à domicile pour les petits saignements et se nomme alors Octim®.

## B. Traitement substitutif

Le traitement substitutif est utilisé lors de traumatismes importants ou lors de chirurgie avec un risque hémorragique non négligeable ou encore en cas de contre-indication à la desmopressine. Il repose sur la perfusion de concentré purifié de facteur Willebrand. Il existe actuellement deux types de concentré disponible :

- *vWF et facteur VIII plasmatique humain (Wilstart®)*. Il est spécifiquement indiqué dans la phase initiale de la maladie de Willebrand quand le traitement par la desmopressine est inefficace ou contre-indiqué. Si le patient présente un déficit en facteur VIII et qu'il doit être traité en urgence, le Wilstart® permettra la correction immédiate des taux de vWF et facteur VIII. La posologie est en général de 40 à 60 UI/kg de vWF et de 20 à 40 UI/kg de facteur VIII. L'administration se fait exclusivement par voie intraveineuse. Le traitement est poursuivi si nécessaire par du vWF seul ;

- *facteur Willebrand seul (Wilfactin®)*. Il est utilisé dans le traitement et la prévention des hémorragies et en cas d'intervention chirurgicale (12 à 24 heures avant). Son administration se fait par voie intraveineuse à une posolgie de 40 à 80 UI/kg.

Il est à noter que l'aspirine et ses dérivés ainsi que l'administration d'AINS (anti-inflammatoires non stéroïdiens) sont contre-indiqués chez ces patients. De même, ces patients doivent signaler leur maladie pour toute intervention chirurgicale bénigne ou importante afin que les mesures de prévention soient prises. Ils doivent, également, posséder une carte sur laquelle est mentionné le type de la maladie de Willebrand afin de faciliter la prise en charge de l'hémorragie au cours d'un accident.

## Conclusion

La maladie de Willebrand est la plus fréquente des anomalies constitutionnelles de l'hémostase, surtout dans sa forme de type 1 et confère un risque hémorragique modéré. Elle affecterait actuellement environ une personne sur cent mais le caractère souvent bénin des symptômes fait que la majorité des individus l'ignore. Ainsi, elle peut être découverte à l'âge adulte au moment d'un bilan préopératoire. Cette maladie présente des manifestations cliniques variables et le diagnostic repose sur des critères génétiques et sur des tests biologiques spécifiques. Le traitement par DDAVP est le traitement de choix pour les formes modérées de type 1 ou dans le cas d'intervention chirurgicale sans risque hémorragique. Pour les types 2 et la forme sévère de type 3, et en cas de chirurgie avec des risques hémorragiques importants, des injections de concentré de facteur de Willebrand sont indispensables. Toutefois, lorsque les facteurs de coagulation ne remontent pas avec la DDAVP, un traitement substitutif est préconisé.

## L'essentiel de la question

La maladie de Willebrand est la plus fréquente des anomalies constitutionnelles de l'hémostase. Cette maladie de transmission autosomale, le plus souvent dominant, est causée par une anomalie quantitative ou qualitative du facteur de Willebrand (vWF), ce qui permet de la classer en deux principaux groupes : un groupe avec déficit quantitatif partiel (type 1) ou total (type 3), un groupe avec un déficit qualitatif (type 2). Cette protéine intervient dans l'hémostase en permettant l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium lésé et leur agrégation. Elle assure, également, le transport et la protection du facteur VIII dans le plasma. Cette maladie présente une expression clinique, phénotypique et génotypique variée. Le diagnostic repose sur des critères génétiques et sur des tests biologiques spécifiques qui permettent de définir le type de la maladie et le traitement adapté qui diffère en fonction du type et de la gravité de la maladie.

*Pour en savoir plus*

- Sebahoun G. Les syndromes mononucléosiques. Hématologie clinique et biologique. Arnette.
- Trossaërt M., Fressinaud E. *Maladie de Willebrand. Hémorragies et thromboses : du diagnostic au traitement*. Paris, Masson, 2004.

# Coagulation intravasculaire disseminée (CIVD)

V. DESPLAT, Laboratoire d'hématologie, Faculté de pharmacie, Bordeaux-II.

- Système protéine C-protéine S : activé par la thrombine, il inactive les facteurs Va et VIIIa. Son taux est diminué pendant la CIVD.
- TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*) : inhibe les facteurs VIIa et Xa. Le taux peut être normal ou diminué lors de CIVD.

### C. Activation de la fibrinolyse

Dans les conditions physiologiques, la fibrinolyse permet la disparition des dépôts de fibrine. Elle permet de lutter contre les microthromboses, mais augmente les complications hémorragiques. Dans les cas de CIVD, la fibrinolyse se trouvant activée en permanence, l'$\alpha$2-antiplasmine ne suffit plus à neutraliser toute la plasmine produite. Elle dégrade la fibrine, le fibrinogène et les facteurs de coagulation (V, VIII, IX, XI), augmentant les risques hémorragiques. L'augmentation des produits de dégradation de la fibrine (PDF), dont les D-Dimères (D-Di), et du fibrinogène sont le reflet de la fibrinolyse.

## III. Étiologie

Les étiologies sont nombreuses mais ont toutes comme point commun la libération et/ou l'activation de facteurs intervenant dans le processus de coagulation. Une CIVD se retrouve le plus souvent au cours d'infections, de chirurgie lourde, en obstétrique et en cancérologie. Elle peut également apparaître au cours d'affections hépatiques, d'infections néonatales, de brûlures ou encore de morsures de serpents. Les principales causes étiologiques sont présentées dans le *tableau 1*.

**Tableau 1.** Principales causes étiologiques

| | |
|---|---|
| **Infections sévères et sepsis :** | bactériennes (Gram – le plus souvent) ;<br>virales (rubéole, rougeole, herpès, varicelle, zona, CMV, VIH…) ;<br>fongiques (aspergillose…) ;<br>parasitaires (plasmodium falciparum, leishmaniose). |
| **Obstétrique :** | hématome rétroplacentaire, embolie amniotique, rétention de fœtus mort, rupture placentaire, prééclampsie, éclampsie. |
| **Cancérologie :** | carcinomes : prostate, estomac, rein, pancréas, sein, poumon, leucémies aiguës myélocytaires M3, M4, M5. |
| **Lésions tissulaires :**<br>**Chocs de toute nature**<br>**Morsure de serpents venimeux** | traumatismes majeurs, embolie graisseuse, brûlures étendues, chirurgie lourde (poumon, prostate, circulation extracorporelle). |
| **Hémolyse intravasculaire :**<br>**Affections hépatiques aiguës et chroniques** | hémolyses aiguës post-transfusionnelles, médicamenteuses, drépanocytose, HPN. |
| **Pédiatrie :**<br>**Tumeur vasculaire, rejet de greffe**<br>**Hypothermie-Hyperthermie** | détresse respiratoire et infections néonatales. |
| **Atteintes vasculaires :** | hémangiome géant (syndrome de Kasabach-Meritt), anévrismes des gros vaisseaux. |

# IV. Clinique

Le tableau clinique est varié en raison des circonstances pathologiques, étiologiques nombreuses et de l'importance des troubles biologiques qu'elles entraînent.

## A. CIVD aiguë

Souvent brutale, elle comporte :
- *un syndrome hémorragique :* ce sont surtout des hémorragies cutanéo-muqueuses, de type purpura, ecchymoses extensives dites « en carte de géographie », pétéchies, épistaxis, gingivorragies, saignement au point de ponction, saignement en nappe du champ opératoire ou des orifices des drains, des cathéters. Il peut également se produire des hémorragies gastro-intestinales, hématuries, hémorragies intracrâniennes qui selon leur localisation peuvent mettre en jeu le pronostic vital du patient ;
- *manifestations thrombotiques atteignant tous les organes* avec :
  - des troubles neurologiques, de la conscience, coma,
  - des lésions cutanées (purpura nécrotique, gangrène périphérique),
  - des atteintes rénales (oligurie et insuffisance rénale),
  - des atteintes pulmonaires (troubles respiratoires, syndrome de détresse respiratoire aiguë),
  - des atteintes digestives (ulcérations aiguës) ;
- *état de choc :* traumatisme sévère avec un syndrome hémorragique ou thrombotique intense.

## B. CIVD chronique

Le syndrome hémorragique est habituellement discret et limité à quelques ecchymoses et épistaxis. Il se rencontre au cours des néoplasies, affections inflammatoires chroniques, hépatiques (insuffisance hépatique chronique), cardiovasculaires (infarctus du myocarde) et certaines pathologies obstétricales (rétention de fœtus mort).

# V. Diagnostic

## A. Biologique

Les signes biologiques sont nombreux avec des niveaux de spécificité variés. Leur association permet de porter le diagnostic de CIVD et d'en évaluer l'importance. Il repose habituellement sur le bilan de l'hémostase qui montre :
- une thrombopénie modérée : le plus souvent, les plaquettes sont comprises entre 50 et $100 \times 10^9$/L. La thrombopénie peut être plus sévère ($< 30\ 10^9$/L) ;

- allongement des tests globaux de coagulation : TQ, TCA, temps de thrombine (TT) variable selon la gravité du processus ;
- diminution du taux de fibrinogène (< 2 g/L, parfois < 0,5 g/l) ;
- diminution des facteurs activateurs : facteurs II, VII + X et surtout du facteur V ;
- signes d'activation du système fibrinolytique : augmentation des produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine (PDF), en particulier des D-dimères (D-Di), présence de complexes solubles (complexes formés par l'association des PDF avec les monomères de fibrine) ;
- signes d'hyperfibrinolyse : raccourcissement du temps de lyse des euglobulines avec une diminution du plasminogène et de l'$\alpha$2-antiplamsine ;
- diminution des inhibiteurs physiologiques de la coagulation : AT et protéines C et S, variable selon l'intensité du processus ;
- présence de schizocytes : érythrocytes fragmentés révélant une anomalie intravasculaire due à la présence de microthrombi sur lesquels les hématies se cassent. Détectés au moment de l'hémogramme, leur existence n'a qu'une faible valeur diagnostique.

La Société internationale sur l'hémostase et la thrombose (ISTH) a établi un score de probabilité de CIVD en cinq étapes utilisant les examens classiques d'exploration de l'hémostase. Il faut tout d'abord évaluer le risque de CIVD, en déterminant si le patient présente une pathologie connue pour être associée à une CIVD. Si c'est le cas, certains tests globaux de coagulation sont pris en compte : taux de plaquettes, TQ, fibrinogène, produits de dégradation de la fibrine ou monomères solubles de fibrine. La figure ci-dessus explique la marche à suivre pour établir le score de CIVD.

## B. Différentiel

### 1. Fibrinolyse primitive

Principal diagnostic différentiel, elle correspond à une activation isolée du système fibrinolytique. Le diagnostic est donné devant une diminution du fibrinogène et une augmentation des PDF associés à un taux stable de plaquettes et des complexes solubles négatifs. Le temps de lyse des euglobulines est très raccourci. Il n'y a donc pas d'activation de la coagulation.

### 2. Insuffisance hépatocellulaire

Elle correspond à un défaut de synthèse des facteurs de coagulation II, V, VII, X. Proche de la CIVD, elle s'en différencie, toutefois, par la négativité des complexes solubles et des taux de PDF ou D-dimères normaux.

# VII. CIVD et leucémies aiguës

Le syndrome de CIVD est très fréquent dans la leucémie promyélocytaire (LAM3) dûe à la libération de facteurs procoagulants par les blastes. La CIVD doit être traitée avant la mise en route de la chimiothérapie. En effet, la lyse des blastes aggrave la CIVD et augmente le risque de mortalité chez le patient. Il faut donc corriger la thrombopénie par transfusion plaquettaire pour obtenir un taux de plaquettes supérieur à 50 000/$mm^3$ et ramener les taux des principaux facteurs de la coagulation à des valeurs proches de la normale par transfusion de plasma frais congelé. Une CIVD peut aussi apparaître dans les leucémies myélomonocytaire (LAM4) et monocytaire (LAM5). Les traitements par chimiothérapie des LAL peuvent provoquer une CIVD qui régresse avec la diminution des cellules leucémiques. Elle est, alors, sans traitement.

# Conclusion

La CIVD est un processus complexe dû à de nombreuses étiologies. Il n'existe pas d'uniformité dans les manifestations cliniques qui sont nombreuses et variées et, par conséquent, il n'existe pas de traitement de choix. Le traitement étiologique est indispensable au traitement de la CIVD et peut parfois suffire. Dans le cas contraire, un traitement substitutif ou spécifique adapté peut lui être ajouté, mais quelle que soit la situation, le but est d'arrêter l'activation de la coagulation afin de réduire les risques hémorragiques ou de thrombose qui s'avéreraient fatales pour le patient.

## L'essentiel de la question

La coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) est un syndrome toujours secondaire à une pathologie déclenchante et caractérisé par une activation anormale de la coagulation se traduisant soit par un syndrome hémorragique, soit par un phénomène thrombotique. Les mécanismes physiopathologiques à l'origine de la CIVD sont multiples et font appel aux processus intervenant dans l'hémostase. Dans la majorité des cas, la synthèse de thrombine est prédominante, ce qui aboutit à la formation anormale de fibrine intravasculaire entraînant des altérations tissulaires et l'activation de la voie extrinsèque de la coagulation. Les manifestations cliniques sont nombreuses et multiples et les signes biologiques présentent des niveaux de spécificité variés. Leur association permet de porter le diagnostic de CIVD et d'en évaluer l'importance. Le traitement étiologique est fondamental et offre les meilleures chances de résoudre la CIVD. S'il ne l'est pas, il existe des traitements substitutifs ou spécifiques.

***Pour en savoir plus***

- Elalamy I. Coagulation intravasculaire disséminée. Encycl Med Chir (Elsevier, Paris), 2006 ; 13-022-C20.

# Les antivitamines K

F. DOUTREMÉPUICH, Laboratoire d'hématologie, UFR de pharmacie, Bordeaux.

*En 1920, une épidémie d'hémorragies atteint le bétail du nord des États-Unis. Des recherches sont alors entreprises. Carl Peter Dam observe l'apparition d'hémorragies spontanées chez des poussins soumis à un régime pauvre en matières grasses. Il en conclut que des extraits hydrophobes de substances végétales peuvent guérir les hémorragies. Des travaux parallèles en clinique humaine rapportaient une tendance hémorragique chez des patients atteints de maladies hépatiques ou d'ictères obstructifs.*
*En 1940, Link isole et identifie la dihydroxycoumarine comme la substance responsable de ces hémorragies. En 1943, Carl Peter Dam et Edward Adelbert Doisy obtiennent le prix Nobel de physiologie pour leurs travaux sur la vitamine K. Depuis 1941, les antivitamines K (AVK) ont trouvé leur place dans le traitement au long cours de la maladie thromboembolique. Ces molécules sont des dérivés de la coumarine et de l'indanedione. Administrés par voie orale, ils ont une action indirecte sur la coagulation : ils modifient la synthèse hépatique des facteurs de la coagulation vitamino-K dépendants.*

# I. Mode d'action

## A. Vitamine K

La vitamine K est un dérivé de la naphtoquinone et comporte une chaîne hydrophobe qui diffère selon l'origine végétale (K1) ou bactérienne (K2) (*fig. 1*).

### 1. Origine

La vitamine K est une vitamine liposoluble apportée par l'alimentation (20 %) ou synthétisée par la flore intestinale (80 %). Son absorption est étroitement liée à la fonction biliaire.

### 2. Gamma-carboxylation et cycle de la vitamine K

La vitamine K, couplée à une carboxylase, intervient au niveau hépatique dans la transformation postribosomale des zymogènes de certains facteurs de la coagulation en protéines actives : prothrombine, proconvertine, facteur Stuart, facteur antihémophilique B, protéines C et S.
Au niveau d'une région spécifique de leur chaîne aminoterminale, ces protéines vitamino-K dépendantes accumulent une dizaine de résidus d'acide glutamique. Afin de permettre la fixation de ces protéines sur les phospholipides membranaires par l'intermédiaire de ponts $Ca^{++}$, ces résidus doivent être convertis en acide gamma-carboxyglutamique. Au cours de cette réaction, la vitamine K active sous forme hydroquinone est transformée en forme époxyde inactive. Par la suite, un époxyde réductase régénère la vitamine K sous forme hydroquinone (*fig. 2*).

## B. Conséquences de l'absence de vitamine K ou de la présence d'AVK

Les AVK ont une structure chimique proche de la vitamine K (*fig. 1*), ce qui leur confère un mode d'action commun : AVK et vitamine K entrent en compétition au niveau des sites d'activation enzymatique de l'époxyde réductase. Les AVK inhibent l'enzyme et ainsi bloquent le cycle de la vitamine K et la gamma-carboxylation.

PIVKA conservent leurs déterminants antigéniques et le dosage des facteurs vitamino-K dépendants par méthode immunologique n'est pas affecté par les AVK.

### C. Effets des AVK sur la concentration plasmatique des facteurs de la coagulation

Le taux plasmatique des facteurs de la coagulation est fonction de la vitesse de synthèse et de la vitesse de dégradation. À l'état normal, synthèse et dégradation sont en équilibre. Après administration d'AVK, l'équilibre est perturbé et une nouvelle stabilisation sera atteinte au bout d'une période fonction de la demi-vie des facteurs de la coagulation.
En principe, il faut attendre quatre à cinq temps de demi-vie. Ainsi, pour le facteur VII ou proconvertine, la demi-vie est de quatre à six heures : la stabilisation sera obtenue au bout d'un jour. En revanche, pour le facteur II ou prothrombine, l'équilibre ne sera atteint qu'après une semaine en raison de sa demi-vie longue (soixante à cent heures).
Les AVK diminuent donc successivement le taux de proconvertine (VII), du facteur antihémophilique B (IX), du facteur Stuart (X) et de la prothrombine (II).
En ce qui concerne la protéine C, inhibiteur physiologique, lors d'un traitement au long cours, son taux peut descendre jusqu'à 0,25 U/ml (taux normal : 0,65-1,45 U/ml). Il faudra tenir compte de ce paramètre lors de la surveillance du traitement afin d'éviter des thromboses par déficit quantitatif en protéine C.

## II. Pharmacocinétique

La connaissance du métabolisme des AVK est fondamentale en raison des nombreuses interférences médicamenteuses. Il existe en outre de nombreuses variations selon les familles de molécules et de leurs différents isomères et en fonction des réactions individuelles propres aux patients.

### A. Résorption

Les AVK sont administrés par voie orale. Leur résorption se fait de façon presque intégrale par le tractus intestinal au niveau de l'estomac et du jujénum en trois à six heures.

### B. Liaison aux protéines plasmatiques

La concentration maximale dans le plasma est atteinte deux à six heures après l'absorption selon les composés. Les AVK se lient de façon réversible et très importante au niveau du site 1 de l'albumine (70 à 97 %) : la fraction liée représente un réservoir alors que l'activité anticoagulante dépend de la fraction libre.

### C. Fixation hépatique

Elle dépend de l'affinité du médicament pour le site récepteur hépatique. Les AVK sont ensuite métabolisés par biotransformation par les mono-oxydases et les conjugases du réticulum endoplasmique des microsomes hépatiques. Certains de ces dérivés peuvent avoir une activité anticoagulante.

## D. Excrétion

L'excrétion se fait soit par la bile sous forme de dérivés inactifs, soit par la circulation sous forme liée à l'albumine qui sera filtrée au niveau glomérulaire. Au niveau de l'intestin, ces substances peuvent être réabsorbées par un cycle entérohépatique, puis excrétées par les urines. L'acénocoumarol est peu ou pas dégradé et est excrété sous forme inchangée dans les urines.

## E. Diffusion

Les AVK traversent la barrière placentaire et diffusent dans le lait maternel. De ce fait, ils peuvent induire des désordres hémorragiques chez le fœtus et des fœtopathies. L'utilisation des AVK est donc contre-indiquée lors de la grossesse.

## F. Paramètres propres à quelques AVK

Les dérivés coumariniques présentent une stéréoisomérie qui influence leurs propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques. Les formes galéniques sont le mélange racémique des isomères R et S en proportion identique. La demi-vie des dérivés dextrogyres est plus longue, mais l'isomère lévogyre est deux à cinq fois plus actif. En fonction de leur délai d'action, les AVK se divisent en trois classes (*tab. 1*) :
- action courte : Tromexane®, Pindione® ;
- action semi-longue : Sintrom®, Previscan® ;
- action longue : Coumadine®.

**Tableau 1.** Caractéristiques pharmacocinétiques des principaux antivitamines K

| Famille | Dénomination commune | Spécialité | Demi-vie | Délai d'action | Durée d'action |
|---|---|---|---|---|---|
| Dérivé de la 4OH Coumarine | Biscoumacétate d'éthyle | Tromexane® | 2 h 30 | 1 à 2 jours | 1 à 2 jours |
| | Warfarine | Coumadine® | 48 h | 2 à 3 jours | 5 à 7 jours |
| | Acénocoumarol | Sintrom® | 9 h | 1 à 2 jours | 3 à 4 jours |
| | Tioclomarol | Apegmone® | 24 h | 1 à 2 jours | 3 à 5 jours |
| Dérivé de l'Indanedione | Phénindione | Pindione® | 6 h | 1 à 2 jours | 2 à 3 jours |
| | Bromindione | Fluidane® | 24 h | 1 à 2 jours | 4 à 5 jours |
| | Parafluorophenyl indianedione | Préviscan® | 6 h | 1 à 2 jours | 2 à 3 jours |
| | Anisindione | Unidone® | 9 h | 1 à 2 jours | 3 à 4 jours |

## G. Biodisponibilité des AVK

Les AVK sont des médicaments difficiles à manipuler en raison des variations dose-effet d'un individu à l'autre, mais aussi pour un même individu en fonction du temps. Différents paramètres entrent en compte pour la biodisponibilité des AVK :
- variation de l'apport en vitamines K ;
- ingestion d'aliments riches en vitamine K1 (choux-fleurs, choucroute, haricots verts, épinards, foie) ;
- perturbations de la flore intestinale ;

- variation de l'absorption des vitamines K : maladie affectant le système hépato-biliaire ;
- variation de la fonction hépatique ;
- synthèse de l'albumine et des facteurs de la coagulation ;
- hypermétabolisme lors de l'hyperthyroïdie ou des états fébriles ;
- diminution du catabolisme lors d'hypothyroïdie ;
- variation au niveau des systèmes récepteurs hépatiques ;
- variation des constantes cinétiques propres à chaque individu.

Ainsi, un traitement par les anticoagulants oraux doit être ajusté individuellement et surveillé très régulièrement.

# III. Interactions

Les AVK sont habituellement prescrits pour un traitement au long cours. Pendant cette période, d'autres thérapeutiques sont susceptibles d'être adjointes et peuvent venir déséquilibrer le traitement anticoagulant du fait du faible index chimiothérapeutique des AVK. Il est donc important de parfaitement connaître l'influence des médicaments et de l'alimentation sur l'effet anticoagulant des AVK.

## A. Interactions pharmacodynamiques

### 1. Apport et absorption des vitamines K

Une alimentation équilibrée et la flore intestinale suffisent normalement aux besoins en vitamines K. Toutes perturbations de ces origines déséquilibrent le traitement anticoagulant. Une consommation importante de certains aliments (choux, haricots verts, etc.) augmente l'apport en vitamine K1 et diminue l'effet des AVK. En revanche, des précautions seront à prendre lors d'une alimentation uniquement parentérale sans apport en vitamines K.
La destruction de la flore intestinale par les antibiotiques à large spectre administrés par voie orale (tétracyclines, chloramphénicol, néomycine) perturbe la synthèse de la vitamine K2 et potentialise l'effet des AVK.
La vitamine K est une vitamine liposoluble absorbée grâce aux sels biliaires. La cholestyramine, résine qui fixe les sels biliaires, diminue l'absorption de la vitamine K. Les huiles minérales (huile de paraffine), non résorbées par le tractus intestinal, et les laxatifs, par augmentation du transit, diminuent aussi la résorption et potentialisent l'effet anticoagulant.

### 2. Influence des antiagrégants plaquettaires

Tout médicament antiagrégant (salicylates, phénylbutazone, sulfinpyrazone, indométacine, ticlopidine, dipyridamole, etc.) augmente la tendance hémorragique.

## B. Interactions pharmacocinétiques

### 1. Au niveau de la résorption

Les AVK sont des acides faibles et les antiacides ou les substances alcalinisantes diminuent la biodisponibilité des AVK. La cholestyramine diminue l'absorption des coumarines et augmente leur élimination en interrompant le cycle entérohépatique.

### 2. Au niveau de la liaison à l'albumine

Les AVK sont très liés à l'albumine (90 à 97 %). Les médicaments fortement fixés à l'albumine et possédant un site de fixation identique ou proche déplaceront les AVK et potentialiseront l'effet anticoagulant. Il s'agit principalement :

- de la phénylbutazone ;
- des salicylates ;
- des sulfamides hypoglycémiants ;
- des sulfamides antibactériens,
- du clofibrate, de l'acide tiénilique ;
- de l'acide étacrynique ;
- de l'acide nalidixique ;
- de l'acide oxalinique ;
- de la phénytoïne ;
- du sulindac.

### 3. Au niveau de la liaison aux récepteurs hépatiques

L'association triméthoprime-sulfaméthoxazole, de même que la quinidine, le clofibrate, les stéroïdes anabolisants et la D-thyroxine faciliteraient la fixation hépatique des AVK, augmentant ainsi l'hypocoagulabilité.

### 4. Au niveau du catabolisme hépatique

Des enzymes (particulièrement des hydroxylases) du réticulum endoplasmique des cellules hépatiques régulent le métabolisme des AVK et d'un grand nombre de médicaments. Ce système enzymatique peut être inhibé par :

- l'allopurinol ;
- le chloramphénicol ;
- la cimétidine ;
- les stéroïdes anabolisants ;
- le disulfiram.

La demi-vie des AVK se trouve allongée et leur effet renforcé. Inversement, d'autres médicaments sont des inducteurs enzymatiques accélérant leur métabolisme hépatique et celui des AVK :

- les barbituriques ;
- la rifampicine ;
- l'éthanol (à forte dose et en chronique) ;
- la glutéthimide ;

### 2. Les indications discutées

- Infarctus du myocarde : l'indication est formelle en cas d'infarctus compliqué (anévrisme, troubles du rythme, infarctus récidivant, insuffisance ventriculaire droite ou gauche). Lors d'un infarctus simple non compliqué, certains auteurs préconisent un traitement par les AVK pendant une à deux années chez des sujets de moins de 70 ans pour éviter les rechutes.
- Pontages aorto-coronariens.
- Accidents vasculaires cérébraux d'origine cardiaque.

## B. Les contre-indications

Certaines sont absolues comme l'ulcère gastroduodénal en poussée, les accidents hémorragiques graves récents, l'hypertension artérielle sévère, l'insuffisance hépatique ou rénale, les hémopathies avec troubles de l'hémostase et la grossesse, les antivitamines K traversant la barrière placentaire. L'allaitement n'est pas une contre-indication formelle bien que les AVK diffusent dans le lait maternel l'hypocoagulabilité du nouveau-né est en effet faible. Des précautions particulières seront à prendre en cas d'accidents vasculaires cérébraux récents, d'antécédents d'ulcères, d'insuffisance biliaire, d'interventions chirurgicales.
Les troubles du comportement psychiatrique ou neurologique sont une contre-indication à évaluer.

# VI. Posologie et surveillance du traitement

En raison des réactions individuelles de chaque individu, la posologie sera adaptée en fonction des tests de surveillance biologique. En général, la prise d'AVK est quotidienne, sauf pour le Tromexane® à durée d'action courte qui nécessite deux prises par jour. Cependant, des doses alternées (deux jours sur trois) peuvent être employées.

## A. Contrôle biologique d'un traitement par les AVK

### 1. Les tests analytiques

#### a) Le temps de Quick ou taux de prothrombine (TP)

Il explore la voie exogène de la coagulation, soit les facteurs II, VII, X et le facteur V. Il mesure le temps de recalcification d'un plasma citraté en présence de thromboplastine. Le TP normal est compris entre onze et quatorze secondes. En France, il est exprimé en pourcentage d'un témoin normal considéré à 100 %. Le taux thérapeutique généralement demandé se situe entre 25 et 35 %.
C'est un test d'utilisation facile mais les laboratoires se heurtent à un problème de standardisation : de nombreuses thromboplastines commerciales existent et leurs caractéristiques peuvent varier considérablement de l'une à l'autre.

Depuis 1983, des experts tentent de standardiser ce test à l'échelon international à partir de thromboplastines de référence. Pour chaque thromboplastine est défini un indice de sensibilité internationale (ISI). Cet indice permet de calculer l'INR ou international normalized ratio :

INR = (temps du patient/temps du témoin)ISI.

Des tables de conversion spécifiques au réactif permettent de passer du taux de prothrombine à L'INR.
Des zones thérapeutiques en INR ont été définies par E.A. Loeliger en fonction de l'importance de l'anticoagulation souhaitée :

- anticoagulation pré- et postopératoire, chirurgie de la hanche : 2,0-3,0 ;
- autre chirurgie 1,5-2,5 ;
- prophylaxie de la thrombose veineuse primitive ou secondaire : 2,0-3,0 ;
- phlébite en évolution, embolie pulmonaire, phlébite récidivante : 2,0-4,0 ;
- prophylaxie artérielle, valve cardiaque artificielle : 3,0-4,5.

#### b) Le thrombotest d'Owren

Il a un avantage sur le TP puisqu'il utilise un réactif standard et explore les quatre facteurs vitamino-K dépendants. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité prothrombinique et la zone d'efficacité au cours d'un traitement par les AVK est comprise entre 6 et 13 %. Ce test est peu ou pas utilisé.

### 2. Le test de coagulation globale : le temps de céphaline kaolin (TCK) ou temps de céphaline activé (TCA)

Il explore la voie endogène et ne rend pas compte du facteur VII. Il a l'avantage d'être automatisable. La zone d'efficacité thérapeutique est comprise entre une fois et demie et deux fois le temps du témoin. La surveillance biologique d'un traitement AVK associe le temps TP et le TCA.

### 3. Autres tests

En cas de déstabilisation du TP, il sera nécessaire d'effectuer un dosage du fibrinogène. Par ailleurs, une fois l'an, une numération-formule sanguine (NFS) doit être réalisée.

## B. Rythmes des contrôles biologiques

### 1. Instauration d'un traitement AVK d'emblée

La posologie est en général d'un comprimé par jour. Un premier contrôle sera effectué en fonction du délai d'action de l'AVK utilisé, entre 48 et 72 heures après la première prise.
Par la suite, des contrôles se feront tous les deux jours la première semaine, puis deux fois par semaine pendant quinze jours. L'ajustement de la posologie se fait au demi ou au quart de comprimé. Lorsque le traitement est équilibré, un contrôle mensuel est suffisant.

## 2. Relais héparine-AVK

L'héparine est maintenue pendant 48 heures, le temps nécessaire à l'obtention des effets des AVK sur le TP. Après 48 heures, l'héparine est arrêtée et un contrôle biologique est effectué le lendemain. Un deuxième protocole existe : 48 heures après la prise d'AVK, les doses d'héparine sont diminuées de façon à avoir un temps de Howell entre 2'30-3' pour un témoin à 2', jusqu'à l'obtention d'un TP entre 25-35 %.

# L'essentiel de la question

Le succès d'une thérapeutique anticoagulante par les antivitamines K dépend de la collaboration étroite malade-médecin-biologiste. En effet, une prescription médicale correcte et son observance par le patient, ainsi que des contrôles biologiques précis et adaptés, doivent assurer l'efficacité et une bonne stabilité de cette thérapeutique. La connaissance de signes d'alerte et l'absence de toute automédication sauvage doivent permettre de prévenir tout accident hémorragique.

# Les héparines

F. DOUTREMÉPUICH, Laboratoire d'hématologie, UFR de pharmacie, Bordeaux.

*L'héparine est un médicament anticoagulant très utilisé dans le traitement curatif et préventif des maladies thromboemboliques. La découverte de l'héparine est due à Jay Mac Lean en 1916. William Henry Howell, en 1918, en a précisé la nature chimique mais ce n'est qu'en 1936 qu'elle a été utilisée pour la première fois chez l'homme comme anticoagulant. À cette époque, l'héparinothérapie n'était fondée que sur des bases empiriques, puisqu'il faudra attendre les années 1970 pour découvrir le mécanisme précis d'action de l'héparine. Depuis, de nombreux travaux se sont attachés à préciser sa structure et son mode d'intervention dans la coagulation : la molécule apparaît être très hétérogène sur le plan physique aussi bien que chimique. Il vaut alors mieux parler des héparines, plutôt que de l'héparine. Ces recherches ont permis la mise au point d'héparines de bas poids moléculaire.*

# I. Les héparines non fractionnées

## A. Fabrication

### 1. Préparation

On retrouve l'héparine dans de nombreux tissus, mais les héparines commerciales sont préparées à partir de l'intestin de porc ou du poumon de bœuf. Plusieurs étapes se succèdent :

- une extraction tissulaire par protéolyse en milieu basique ;
- une purification par précipitation à l'aide d'un ammonium quaternaire : l'héparine très acide, fixe l'ammonium quaternaire : les sels formés, très insolubles, sont ainsi séparés ;
- une dépyrogénation, une décoloration, puis une élimination des réactifs sont les étapes finales.

On obtient ainsi l'héparine sous forme de sel de sodium, calcium ou magnésium (les sels de lithium sont utilisés comme anticoagulant des prélèvements sanguins).

### 2. Contrôles

Plusieurs tests de contrôle sont alors effectués selon les normes de la *Pharmacopée française* [1].

#### a) Caractères

L'héparine se présente sous la forme d'une poudre blanche, modérément hygroscopique et facilement soluble dans l'eau.

1. *Pharmacopée française*, 10^e^ édition, juillet 1986.

### b) Identifications

L'héparine sodique ou calcique retarde la coagulation du sang frais : son pouvoir rotatoire ne doit pas être inférieur à + 35° (en général 45 ± 5°) : une électrophorèse de zone peut être aussi utilisée.

### c) Essais

La solubilité est vérifiée en diluant 50 000 UI d'héparine dans 10 ml d'eau. La solution obtenue doit être limpide et son pH compris entre 5,5 et 8,0.
La recherche des protéines se fait par addition d'acide trichloracétique : l'absence de précipité ou de trouble signe la non-présence de protéines. La teneur en azote (mesurée par la méthode de Kjeldahl) ne doit pas être supérieure à 2,5 %. L'héparinate doit contenir 9,5 à 12,5 % de $Na^+$ ou de $Ca^{++}$ calculé par rapport à la substance desséchée. La teneur en soufre (titrée par le perchlorate de baryum en présence d'alizarine) calculé par rapport à la substance desséchée n'est pas inférieure à 10 %. La limite tolérée pour les métaux lourds est de 30 ppm.
La perte à la dessiccation ne doit pas être inférieure à 8 %. Le taux de cendres sulfuriques, calculé par rapport à la substance desséchée, varie de 30 à 40 %.
La recherche de pyrogènes se fait sur les lapins, la vérification de la non-toxicité sur des souris et l'essai pour les substances hypotensives chez le chat.

### d) Titrage

L'activité anticoagulante d'une héparine est évaluée *in vitro* en comparant sa capacité à retarder la coagulation d'un plasma de mouton citraté puis recalcifié à celle d'une héparine étalon dont la correspondance en unités internationales (UI) est donnée par l'Organisation mondiale de la santé (OMS).

## 3. Méthode

Un pool de plasma de mouton est recueilli sur une solution anticoagulante (citrate 8,7 g, aprotinine 4 mg, eau qsp 100 ml) à raison d'un volume d'anticoagulant pour 19 volumes de sang. Après centrifugation (5 000 g), le plasma séparé est réparti en tubes et congelé rapidement. Au moment de l'utilisation, la décongélation se fait à 37 °C.
L'héparine à doser et l'héparine étalon sont diluées dans une solution de chlorure de sodium isotonique, de façon à obtenir deux séries de dilution géométrique. Le nombre d'UI/ml contenu dans chaque tube de la série étalon est connu avec précision.
Deux séries de tubes contenant 1 ml de plasma préparé comme ci-dessus reçoivent les différentes dilutions étalon pour l'une, les dilutions de l'héparine à doser pour l'autre. L'ensemble repose dans un bain-marie à 37 °C. Chaque tube se voit alors ajouter 1 ml d'une dilution de céphaline + activateur (kaolin). On ajoute 1 ml d'une solution de chlorure de calcium à 0,37 % dans l'eau après exactement deux minutes. On déclenche alors un chronomètre pour mesurer le temps de coagulation. Les temps sont transformés en logarithmes et rapportés sur une courbe en fonction du nombre d'UI/ml qu'ils représentent.

## B. Structure et site de liaison

L'héparine est une substance très hétérogène appartenant à la série des glycosaminoglycanes sulfatés. Sa masse moléculaire varie de 3 500 à 35 000 daltons avec une moyenne à 14 000 daltons. Les chaînes sont porteuses de résidus aminés, sulfatés et acétylés en nombre et positions variables.

### 1. Structure de base

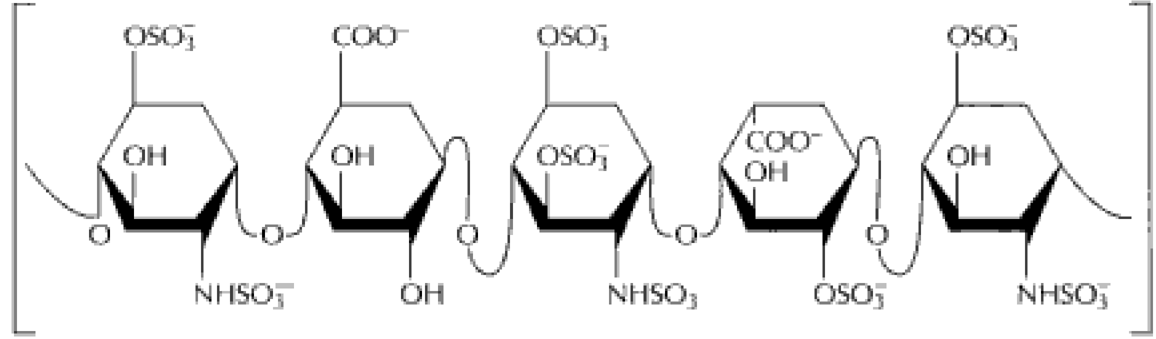
Les chaînes glucidiques sont composées d'une alternance de D-glucosamine et d'acide uronique : acide uronique-glucosamine, acide uronique-glucosamine… On retrouve en fait deux acides uroniques différents dans la chaîne : l'acide D-glucuronique et l'acide L-iduronique, qui peuvent de plus porter d'autres groupes encore.
La structure spatiale, le nombre et la position des groupements sulfatés permettent l'interaction de l'héparine avec diverses protéines.

### 2. Site de liaison

L'héparine exerce son activité anticoagulante en présence de l'antithrombine III (ATIII) dont elle potentialise l'effet inhibiteur sur les sérines protéases de la coagulation.
Plusieurs études ont été menées afin de préciser la structure du site de liaison de l'héparine à VATHL. En 1979, R. D. Rosenberg a séparé deux fractions d'héparine par chromatographie d'affinité pour l'ATIII :

- une première fraction, représentée par les deux tiers de l'héparine de départ, ne se fixe pas sur l'ATIII. Elle possède 15 % de l'activité anticoagulante ;
- une deuxième fraction, représentée par un tiers de l'héparine de départ et affine pour l'ATIII, possède 85 % de l'activité anticoagulante.

Dans cette dernière fraction, il a remarqué une séquence, un tétrasaccharide, fréquemment retrouvée dans les chaînes d'héparine affines pour l'ATIII. Pour Rosenberg, ce tétrasaccharide correspondait à la zone de fixation de l'héparine à l'ATIII.
En 1979, U. Lindhall isole un hexasaccharide qui inclut le tétrasaccharide de Rosenberg. En 1980, J. Choay, par dépolymérisation enzymatique et par chromatographie d'affinité pour l'ATIII, montre que le site minimal de liaison de l'héparine possédant une haute activité inhibitrice sur le facteur Xa est un pentasaccharide. En 1983, J. Choay et M. Petitou réussissent la synthèse chimique de ce pentasaccharide (*fig.*).




N sulfate O sulfate 6 D glucosamine 1 → 4 Ac. D glucuronique 1 → 4 N sulfate di O sulfate 3,6 D glucosamine 1 → 4 Ac O sulfate 2 L iduronique 1 → 4 N sulfate D glucosamine.

**Figure 1.** Schéma et formule du pentasaccharide

## C. Propriétés pharmacologiques de l'héparine

### 1. Propriétés liées à la liaison avec l'ATIII

#### a) ATIII

L'ATIII est une protéine plasmatique de masse moléculaire de 58 000 daltons, synthétisée par le foie et par les cellules endothéliales. Sa concentration plasmatique est de 300 mg/L ou 2 µM. Sa demi-vie est de trois jours. L'ATIII est l'un des principaux inhibiteurs physiologiques des sérines protéases de la coagulation.

#### b) Formation des complexes

L'ATIII forme un complexe équimoléculaire avec des enzymes de la coagulation, les sérines protéases (sauf le facteur Va). La vitesse de la réaction d'inhibition de ces enzymes est lente.
En présence d'héparine, cette cinétique est plus rapide : la fixation de l'héparine sur des résidus lysine de l'ATIII entraînerait un remaniement de la conformation spatiale de l'inhibiteur. Le site réactif arginine de l'ATIII se trouverait ainsi démasqué et plus accessible au site sérine des protéases. Deux facteurs de la coagulation sont plus sensibles à cette inhibition : le facteur IIa (la thrombine) et le facteur Xa.

### 2. Interaction avec l'héparine cofacteur II (HCII)

L'HCII est une glycoprotéine de masse moléculaire de 65 000 daltons. Sa composition en acides aminés est voisine de l'ATIII mais elle ne possède pas de communautés antigéniques avec celle-ci. Elle serait synthétisée par le foie. Sa concentration plasmatique est de 90 mg/L ou 1,4 µM.
L'HCII a une action inhibitrice sélective sur la thrombine. Elle n'a pas d'effet sur le facteur Xa, la plasmine ou la trypsine. L'inhibition de la thrombine par l'HCII est beaucoup plus lente qu'avec l'ATIII. Cependant, elle est accélérée en présence de très fortes concentrations d'héparine.

### 3. Interaction avec les cellules endothéliales

L'héparine possède la faculté de se fixer sur les cellules endothéliales. Elle accroît ainsi les charges électronégatives de la surface et favorise la résistance au processus thrombotique.

### 4. Rôle dans la fibrinolyse

E.-G. Vairel a observé en 1983 une augmentation du taux de l'activateur vasculaire du plasminogène en présence d'héparine, cette dernière favorisant ainsi la lyse des caillots.

### 5. Rôle dans l'athérosclérose

H. Engelberg a précisé le rôle de l'héparine dans la prévention de l'athérosclérose. Cette substance agit sur plusieurs paramètres par son action sur l'endothélium vasculaire : elle prévient le processus de thrombose et diminue la capacité d'adhé-

D'autres protocoles sont aussi utilisés en tenant compte de la chirurgie et surtout du type d'anesthésie.

### 2. Traitement curatif

L'héparine sera utilisée à forte dose, de préférence par voie intraveineuse et en continu, à l'aide d'une seringue électrique afin d'éviter des concentrations plasmatiques en « dents-de-scie », avec des périodes d'hypocoagulabilité importante, génératrices d'hémorragies. L'un des schémas thérapeutiques débute par une dose charge de 100 UI/kg, puis le traitement est poursuivi sur la base de 500 UI/kg/24 h, en ajustant la posologie en fonction des résultats des tests biologiques.
L'héparinothérapie est particulièrement indiquée dans les thromboses veineuses, dans l'embolie pulmonaire et lors de thromboses artérielles afin de limiter l'extension du thrombus. Son utilisation dans l'infarctus du myocarde en phase aiguë diminue la fréquence des thromboses intracardiaques et des embolies systémiques.

### 3. Indications particulières

L'héparinothérapie est aussi employée au cours de certaines coagulations intravasculaires disséminées afin de s'opposer à l'activation entretenue de la coagulation sanguine.
L'héparine permet également l'incoagulabilité complète du sang lors des circulations extracorporelles et de l'hémodialyse.
Ainsi, lors des circulations extracorporelles (CEC) pour chirurgie cardiaque, l'héparine sera d'abord administrée à la dose d'environ 300 UI/kg après la pose de la CEC au patient. Un temps de céphaline activé (TCA) sur sang total sera réalisé, généralement avec un appareil de type Hemotech ou Hemochron®, ce qui permet de suivre l'évolution de l'héparinémie. En circulation extracorporelle, le TCA doit toujours être à supérieur à 400 secondes pour éviter tout risque d'activation de la coagulation par les biomatériaux ainsi que par l'air lors des aspirations. À la fin de la CEC, l'héparine sera neutralisée par la protamine.

## F. Surveillance de l'héparinothérapie

### 1. Bilan préthérapeutique

Avant toute héparinothérapie, un bilan complet sera pratiqué :
- un interrogatoire orienté permettra de déceler toute tendance hémorragique et/ou thrombotique du patient (origine génétique ou acquise) et de rechercher les contre-indications au traitement ;
- un examen sanguin comprenant une numération-formule sanguine (NFS), un temps de céphaline activé, un Temps de Quick (TQ) et une numération plaquettaire sera toujours effectué ;
- dans le cas de thromboses veineuses récidivantes où l'enquête familiale est positive, la recherche d'un déficit congénital en ATIII, protéine C ou plasminogène pourra être indiquée.

## 2. Surveillance du traitement

L'héparinothérapie entraîne une hypocoagulabilité faible dans un traitement préventif, plus importante en curatif : la surveillance doit donc être régulière et les posologies adaptées selon les résultats biologiques afin d'éviter une complication hémorragique.

### a) Tests de coagulation globaux

#### ■ *Temps de Howell*

Test peu utilisé.

#### ■ *Temps de céphaline activé ou avec activateur*

Il est réalisé par addition au plasma d'un activateur de la voie intrinsèque (par exemple le kaolin) puis de céphaline (phospholipide).
Le temps de coagulation est normalement de 40 secondes. Dans le cas d'une héparinothérapie efficace, ce temps doit être égal à 1,5 à 2,5 fois le temps du témoin soit 60 à 80 secondes. Ces temps peuvent varier suivant les laboratoires et les réactifs utilisés : il est donc nécessaire d'établir des normes propres au laboratoire.

### b) Mesure de l'héparinémie circulante

Pour ces méthodes, l'utilisation de plasma étalonné en héparine permet de traduire les temps de coagulation ou les densités optiques en héparinémie (en UI/ml).

#### ■ *Méthodes chronométriques*

- *Temps de thrombine* (TT) : l'addition de thrombine calcique à un plasma citraté détermine le temps de thrombine. La présence d'héparine prolonge le temps de coagulation du plasma. À l'état normal, ce temps est compris entre 20 et 25 secondes.
- *Étude de l'activité anti-Xa* : au plasma contenant de l'héparine est ajouté un excès d'ATIII. Le complexe héparine-ATIII agit sur un excès connu de facteur Xa purifié additionné au plasma. La mesure de l'activité enzymatique du facteur Xa résiduel est effectuée :
  – soit par son action coagulante sur un plasma substrat en présence de $CaCl_2$,
  – soit par un temps de coagulation par addition d'un mélange de $CaCl_2$, de céphaline et de plasma bovin (méthode de Yin et Wessler).

#### ■ *Méthodes chromogéniques*

*Principe* : le plasma hépariné est dilué en tampon contenant de l'ATIII. Le complexe formé réagit sur un excès connu de facteur Xa ou Ia. L'activité résiduelle enzymatique du facteur sera mesurée grâce à l'hydrolyse d'un substrat qui libérera une quantité de paranitroaniline (pNA) inversement proportionnelle à la quantité d'héparine.

### c) Prélèvements

- Lors d'une *perfusion continue*, l'héparinémie est stable : le prélèvement est possible à tout moment. Le but est d'obtenir : héparinémie 0,2-0,3 UI/ml, TCA 1,5 à 2 fois le temps du témoin.

- Lorsque l'*injection IV est discontinue*, le contrôle est réalisé aux trois quarts de l'intervalle du temps entre deux injections mais des variantes peuvent exister en fonction des équipes médicales. Le but est d'obtenir : héparinémie 0,2-0,3 UI/ml, TCA 1,5 à 2 fois le temps du témoin.
- Si les injections sont réalisées par *voie sous-cutanée*, le contrôle peut être effectué :
  – aux trois quarts de l'intervalle du temps entre deux injections : héparinémie 0,2-0,3 UI/ml, TCA 1,5 à 2 fois le temps du témoin,
  – au milieu de deux injections : héparinémie 0,3-0,4 UI/ml, TCA 2 à 2,5 fois le temps du témoin.
- Les zones thérapeutiques de l'héparinémie et du TCA varient aussi en fonction de la pathologie (on recherche une héparinémie plus forte en cas d'embolie pulmonaire), de l'âge du patient et des différents facteurs de risque. Des zones thérapeutiques plus larges peuvent ainsi être définies :
  – héparinémie : 0,2 à 0,5 UI/ml,
  – TCA : 1,5 à 2,5 fois le temps du témoin.

### 3. Surveillance des effets secondaires de l'héparine

Il apparaît nécessaire d'associer au bilan de surveillance classique :
- une numération plaquettaire tous les jours en raison des thrombopénies induites par l'héparine ;
- un dosage de l'ATIII afin de vérifier si le taux du cofacteur est suffisant pour avoir une thérapeutique efficace ;
- enfin, une numération globulaire ainsi qu'un taux de l'hémoglobine dans les traitements au long cours afin de déceler d'éventuelles anémies, conséquences des hémorragies internes, même minimes.

## G. Relais de l'héparine par les antivitamines K (AVK)

Le traitement par les antivitamines K doit débuter avant la fin de l'héparinothérapie en raison du délai d'action de ces médicaments et de la diminution de l'ATIII induite par l'héparine, à l'origine de manifestations thromboemboliques.
Durant les premiers jours du relais, la posologie de l'héparine n'est pas changée. Par la suite, les doses d'héparine sont réduites en fonction de l'effet des AVK mesuré par le temps de Quick ou le thrombotest d'Owren. L'arrêt de l'héparinothérapie se fait lorsque le traitement par les AVK est efficace.

## H. Complications liées à l'héparinothérapie

### 1. Hémorragies

Les hémorragies sont une complication majeure du traitement par l'héparine. Elles peuvent survenir en cas de surdosage ou bien lorsque l'héparinothérapie est associée à un autre facteur d'hypocoagulabilité (administration d'antiagrégants plaquettaires, thrombopénie, insuffisance hépatique, etc.).

### 2. Thrombopénies

Les thrombopénies peuvent avoir deux origines : la première est la conséquence de la formation d'agrégats plaquettaires. Dans ce cas, la thrombopénie est modérée et transitoire.
L'autre mécanisme est de nature immunologique. La thrombopénie est alors sévère et s'accompagne généralement de thromboses.

### 3. Ostéoporose

L'ostéoporose peut se rencontrer lors de traitements prolongés et à forte dose.

### 4. Thromboses veineuses

De rares processus de thromboses par consommation d'ATIII peuvent parfois s'observer à l'arrêt de l'héparinothérapie.

## I. Neutralisation de l'héparine

La protamine neutralise l'effet anticoagulant de l'héparine : elle dissocie le complexe héparine-ATIII en se liant à l'héparine. Le nouveau complexe n'a pas de propriétés anticoagulantes.
Il faut ajuster les doses de protamine en fonction de l'héparine administrée en tenant compte de la demi-vie, sachant que 1 mg de protamine neutralise environ 100 UI d'héparine.

## J. Interactions médicamenteuses

Ces interactions sont d'ordre synergique, c'est-à-dire, que toute substance agissant sur l'hémostase et la coagulation potentialise les effets de l'héparine : les antiagrégants plaquettaires, les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les AVK, etc. Il existe aussi des incompatibilités médicamenteuses : l'association de l'héparine dans un flacon de perfusion est fortement déconseillée avec les antibiotiques, les psychotropes, les glucocorticoïdes et les antalgiques morphiniques.

## K. Contre-indications

Les contre-indications absolues de l'héparinothérapie sont :
- la neurochirurgie récente ;
- les maladies hémorragiques ;
- l'hypertension artérielle maligne.

Il existe aussi des contre-indications relatives :
- les accidents vasculaires cérébraux récents ;
- l'hypertension artérielle non contrôlée ;
- l'insuffisance hépatique et/ou rénale sévère ;
- l'ulcère gastro-duodénal évolutif, l'impossibilité de surveillance clinique et/ou biologique.

# II. Héparines de bas poids moléculaire (HBPM)

Depuis quelques années, la mise au point d'héparines de bas poids moléculaire a permis de diminuer de façon notable l'activité anticoagulante, tout en conservant une activité antithrombotique comparable à celle des héparines non fractionnées.

## A. Préparation

Divers procédés sont utilisés dans la préparation des HBPM. Ils reposent sur la coupure de liaisons interglycosidiques de l'héparine par extraction alcoolique, gel filtration ou dépolymérisation (par des réactifs chimiques et par désamination contrôlée). Les produits obtenus sont des fragments d'héparine dont la masse moléculaire varie de 4 000 à 8 000 daltons.

## B. Propriétés des héparines de bas poids moléculaire

### 1. Propriétés liées à l'ATIII

Tout comme les héparines non fractionnées, les HBPM agissent par l'intermédiaire de l'ATIII. Cependant, leur activité inhibitrice est différente selon le facteur considéré : en effet, l'inhibition du facteur Xa est plus importante que celle de la thrombine (IIa).

### 2. HCII

L'HCII n'est pas sensible à l'effet des héparines de bas poids moléculaire : l'activité antithrombine de l'HCII n'est pas potentialisée par les HBPM.

### 3. Action sur la fibrinolyse

Les travaux de E.-G. Vairel et F. Doutremepuich, menés en parallèle entre l'héparine et une HBPM, ont montré que ces substances augmentaient le taux de l'activateur vasculaire du plasminogène de façon comparable.

### 4. Action sur les plaquettes

À l'heure actuelle, peu de cas de thrombopénies induites par les héparines de bas poids moléculaire ont été décrits dans la littérature : il semble donc que les HBPM aient moins d'effets sur les plaquettes.

## C. Pharmacocinétique

Des études ont montré qu'après injection sous-cutanée, l'héparinémie mesurée par son activité anti-Xa diminue plus rapidement avec les héparines non fractionnées qu'avec les HBPM : la demi-vie des HBPM est de quatre heures (60 à 90 minutes pour l'héparine). D'autre part, les HBPM présentent une meilleure biodisponibilité (98 %), expliquée peut-être par la petite taille des molécules qui faciliterait le passage rapide du produit. Les HBPM ne traversent pas la barrière placentaire.

## D. Indications et posologies

### 1. HEPM utilisées en thérapeutique

Actuellement, à titre d'exemple :
- tinzaparine (Innohep®) ;
- énoxaparine (Lovenox®) ;
- daltéparine (Fragmine®) ;
- nadroparine (Fraxiparine®).

### 2. Indications et posologies

La Fraxiparine® est commercialisée pour la prévention de la maladie thromboembolique : la posologie préconisée est de 7 500 U anti-Xa IC/24 h. Dans la même indication, les posologies de 40 mg une fois par jour ou de deux injections de 20 mg pour l'énoxaparine et de 16 mg pour la daltéparine se sont avérées efficaces et bien tolérées.
Actuellement, l'emploi des HBPM s'étend à d'autres domaines : le traitement curatif des thromboses veineuses, le traitement de l'embolie pulmonaire et l'hémodialyse. Les essais effectués pour ces indications tentent de préciser les posologies exactes à utiliser dans chaque cas.
Il se dégage des premières études cliniques effectuées à l'aide de ces fractions d'héparine une activité antithrombotique comparable sinon supérieure à celle de l'héparine non fractionnée, un risque hémorragique inférieur, et un bénéfice pour le patient qui ne reçoit qu'une seule injection sous-cutanée par 24 heures (au lieu de trois) pour le traitement préventif.

## E. Surveillance

L'hypocoagulabilité engendrée par les HBPM est faible : en effet, le TCA est souvent très peu allongé du fait de la faible activité anti-IIa. La surveillance du traitement préventif des thromboses veineuses est donc réalisée par la mesure de l'activité anti-Xa soit par méthode chronométrique, soit par méthode chromogénique, pour vérifier l'héparinémie circulante.
Pour le traitement curatif, la surveillance biologique se fait par le dosage de l'activité anti-Xa et le TCA. Les deux tests reflètent la présence du médicament, mais ils ne sont pas corrélés à son efficacité. De récents travaux ont montré que la protamine agissait aussi bien sur la neutralisation de l'héparine que sur les HBPM, mais que les doses variaient selon les fractions et qu'une activité anti-Xa résiduelle persistait.

## L'essentiel de la question

Les héparines sont des molécules mucopolysaccharidiques d'origine naturelle, dont l'activité biologique repose sur une séquence commune (pentasaccharide), mais dont la structure est très variable. On les classe en « Héparines non fractionnées » (HNF) et « Héparine de Bas Poids Moléculaire » (HBPM).
L'efficacité anticoagulante des héparines s'accompagne d'un risque de complication, hémorragique notamment, potentiellement grave. La sécurité d'emploi dépend largement du respect des modalités de prescription, posologie et surveillance, même si l'utilisation des HBPM dans beaucoup de situations cliniques en a simplifié l'utilisation.

*Depuis une vingtaine d'années, de nombreux travaux ont montré le rôle primordial joué par les plaquettes dans la survenue d'accidents thromboemboliques artériels. Ainsi les médicaments inhibant les fonctions plaquettaires sont-ils rapidement devenus des molécules de premier choix. Ils sont indiqués dans la prévention des récidives d'infarctus du myocarde, des récidives d'accident ischémique en cas d'artérite des membres inférieurs, d'accident vasculaire cérébral ischémique transitoire ou permanent. Ils sont également indiqués dans d'autres circonstances, dont l'angor instable et l'angioplastie coronaire. Dans la plupart des cas, aucune surveillance biologique n'est nécessaire, hormis pour le risque de cytopénie induite par le Ticlid®. En effet, un allongement du temps de saignement n'est prédictif ni de l'efficacité du traitement ni du risque hémorragique.*
*Certains antiplaquettaires peuvent inhiber une seule voie d'activation plaquettaire, c'est notamment le cas de l'aspirine ou du clopidogrel. De nombreux travaux ont montré un réel intérêt à l'association de plusieurs de ces molécules. D'autres, en revanche, peuvent inhiber l'agrégation plaquettaire dans sa globalité et ce quel que soit le mécanisme d'activation en cause, comme les inhibiteurs du complexe glycoprotéique (GP) plaquettaire GP IIbIIIa (αIIbβ3). Les contre-indications de ces traitements sont classiquement les maladies hémorragiques acquises et constitutionnelles, toutes les lésions susceptibles de saigner, les accidents vasculaires cérébraux récents, une intervention neurochirurgicale récente, etc. Les antiplaquettaires font l'objet de nombreux essais thérapeutiques à grande échelle et au long cours. Ces essais tentent d'évaluer, en termes de diminution de la morbidité et de la mortalité, le rapport bénéfice-risque de la prescription de ces traitements dans les préventions primaire et secondaire d'accidents thromboemboliques artériels et, en association avec d'autres médicaments, dans le traitement de la phase aiguë de l'infarctus du myocarde (voir tableau). Nous avons choisi de présenter ces thérapeutiques antiplaquettaires en fonction de leur mécanisme d'action.*

**Tableau 1.** Indications des principaux agents antiplaquettaires

| Voie | Agents antiplaquettaires | Posologie | Indications | Effets indésirables |
|---|---|---|---|---|
| Orale | Aspirine (Catalgine®, Aspégic®, Kardégic®, etc.) | 100 à 350 mg/j | Préventions primaire et secondaire de la thrombose artérielle<br>Angioplastie des coronaires | Saignements gastro-intestinaux |
| | Ticlopidine (Ticlid®) | 250 mg x 2/j | Prévention secondaire de la thrombose artérielle<br>Angioplastie des coronaires (+ aspirine) | Agranulocytoses<br>Thrombopénies |
| | Clopidogrel (Plavix®) | 75 mg/j (± bolus) | Idem | Rashes cutanés<br>Diarrhées |
| IV* | Iloprost, (Ilomédine®) | 1 à 4 ng/kg/min | Ischémie de la maladie de Buerger | Flushes faciaux<br>Céphalées |
| | Abciximab, (Reopro®) | 0,25 ng/kg en bolus, puis 10 μg/min pendant 12 h | Angioplastie des coronaires (patients à haut risque) | Thrombopénies |
| | Eptifibatide, (Integrilin®) | 180 μg/kg en bolus, puis 2 μg/kg/min jusqu'à 72 h | Angioplastie, angor instable, infarctus sans ondes Q, en association avec héparine et aspirine | Précautions d'emploi en cas d'insuffisance rénale |
| | Tirofiban, (Agrastat®) | 0,4 μg/kg/min pendant 30 min, puis 0,1 μg/kg/min | Angioplastie, angor instable, infarctus sans ondes Q, en association avec héparine et aspirine | |

* Voie intraveineuse, réservé à l'usage hospitalier.

## 2. Pharmacocinétique

L'aspirine administrée par voie orale est absorbée de façon rapide et passive au niveau du duodénum. Sa demi-vie est de l'ordre de trente minutes. Elle est rapidement hydrolysée dans la circulation et les tissus par des estérases en acide salicylique. Elle circule fortement liée aux protéines plasmatiques, ce qui peut être à l'origine d'interactions médicamenteuses. Puis elle subit un métabolisme hépatique et les métabolites sont éliminés par le rein. L'aspirine traverse la barrière placentaire.

## 3. Indications

Le but du traitement est d'obtenir la meilleure efficacité sur la morbidité et la mortalité en minimisant le plus possible les incidents et accidents hémorragiques liés à la prise d'aspirine au cours des indications suivantes :

- la phase aiguë et subaiguë de l'infarctus du myocarde : en général, 250 mg/jour pendant au moins cinq semaines en association avec des anticoagulants et/ou un thrombolytique (phase aiguë) ;
- la prévention primaire de l'infarctus du myocarde chez un malade à risque vasculaire élevé ;
- la prévention secondaire, c'est-à-dire la prévention du risque de récidive après un premier accident thromboembolique artériel (infarctus du myocarde, accident ischémique cérébral) ;
- la prévention des risques d'éclampsie à partir du second trimestre de la grossesse ;
- la prévention des risques de thrombose en chirurgie cardio-vasculaire lors des pontages coronariens et angioplasties, au cours de l'angor instable, dans l'artérite chronique des membres inférieurs, les thrombocytémies primitives.

## 4. Formes galéniques

Elles diffèrent principalement par le lieu et la cinétique d'absorption. Les spécialités les plus prescrites en cardiologie sont présentées dans le *tableau*.

## 5. Effets indésirables et contre-indications

Les effets secondaires, bien que réduits aux posologies utilisées, sont représentés par les incidents et accidents hémorragiques (épistaxis, gingivorragies, hématémèses, melænas, hématuries, etc.), les antécédents récents d'ulcérations gastriques et duodénales et d'hypersensibilité qui sont, de fait, des contre-indications au traitement lorsqu'ils préexistent.

Des précautions d'emploi sont signalées en cas d'insuffisance rénale ou hépatique majeure ainsi qu'au cours du premier trimestre de la grossesse. Il existe une potentialisation du risque hémorragique lors de l'administration concomitante d'anticoagulants oraux, des héparines, d'autres AINS et d'autres antiplaquettaires. Il existe un risque de potentialisation de l'effet des hypoglycémiants oraux.

## B. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) autres que l'aspirine

L'indométacine (Indocid®), l'ibuprofène (Brufen®), le flurbiprofène (Cebutid®) ont un mécanisme d'action similaire à celui de l'aspirine. Toutefois, leurs effets sont réversibles par inhibition compétitive de la cyclo-oxygénase plaquettaire. Un seul essai clinique utilisant le flurbiprofène a permis l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour cette molécule dans certaines indications. Les fonctions plaquettaires se normalisent en quelques jours à l'arrêt du traitement.

## C. Molécules en développement

Un inhibiteur direct du récepteur TP au thromboxane A2 est actuellement en phase 3. Il s'agit du terutroban (*fig. 1*).

# II. Inhibiteurs de l'agrégation par l'ADP : ticlopidine (Ticlid®) et clopidogrel (Plavix®)

Ces molécules appartiennent à la famille des thiénopyridines (*fig. 2*).

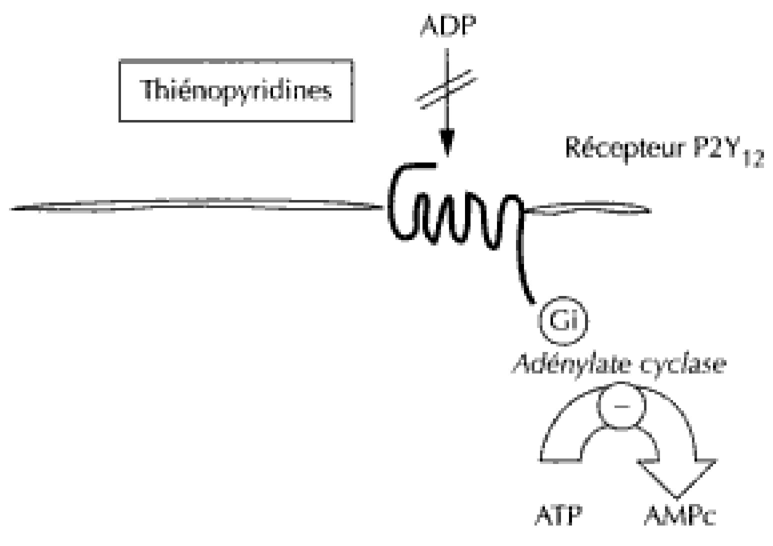



**Figure 2.** Mécanisme d'action des thiénopyridines

## A. Ticlopidine

Le Ticlid® est inscrit sur la liste I. Il inhibe de manière sélective et puissante l'activation des plaquettes induites par l'ADP en empêchant la liaison de l'ADP à son récepteur membranaire. Par voie de conséquence, il inhibe l'agrégation des plaquettes résultant de l'activation de GP IIbIIIa.
L'effet du Ticlid® est dose-dépendant et irréversible, médié par les *métabolites* hépatiques de la ticlopidine et, ainsi, un délai de plusieurs jours est nécessaire pour obtenir l'effet maximal. La posologie recommandée est de 500 mg/jour en deux prises dans les indications suivantes :
- prévention des récidives d'accident ischémique cérébral lié à l'athérosclérose ;

- prévention des ischémies chez les malades à risque vasculaire élevé et prévention des troubles plaquettaires induits lors des circulations extracorporelles.

Les effets indésirables les plus redoutables sont la *pancytopénie* ou l'*agranulocytose*, ce qui impose une surveillance de l'hémogramme deux fois par mois pendant les trois premiers mois de traitement. D'autres effets indésirables ont été signalés : manifestations digestives, hémorragiques, troubles cutanés, etc.

Les contre-indications sont les maladies hémorragiques acquises et constitutionnelles, les lésions susceptibles de saigner, les antécédents d'allergie ou de cytopénie au Ticlid® et la grossesse. Le risque hémorragique est majoré lors de l'association à tout traitement anticoagulant ou antiplaquettaire.

### B. Clopidogrel (Plavix®)

Le Plavix® est également inscrit sur la liste I. Son mécanisme d'action est identique à celui de la ticlopidine. Le clopidogrel n'est qu'une prodrogue, l'un de ses métabolites thiol est le principe actif. Ce métabolite hépatique actif thiol se lie au récepteur à l'ADP $P2Y_{12}$ et le bloque de façon irréversible. Il en découle une élévation de l'AMP cyclique (AMPc) intraplaquettaire et, par conséquent, une diminution de la mobilisation du calcium intraplaquettaire et une inhibition de l'agrégation (*fig. 2*). Le développement du clopidogrel (Plavix®, essai CAPRIE) a permis d'obtenir un antiplaquettaire puissant à faible dose (75 mg/jour en une seule prise, demi-vie de huit heures) et pratiquement dépourvu du risque d'agranulocytose induit par la ticlopidine. De ce fait, il a largement supplanté la ticlopidine. Les thiénopyridines sont contre-indiquées en cas d'insuffisance hépatique ou rénale sévère. Un délai de plusieurs jours est nécessaire pour obtenir l'effet maximal, ce qui a conduit à l'élaboration de doses de charge du Plavix® (300 à 600 mg) pour obtenir un effet inhibiteur en deux à six heures. En corollaire, l'effet persiste plusieurs jours après l'arrêt du traitement, comme pour l'aspirine. Il existe de nombreux cas de résistance biologique ou clinique à l'aspirine et au clopidogrel, ce qui mène au développement de nouvelles molécules, comme celles dirigées contre le récepteur $P2Y_{12}$, dont certaines sont des prodrogues (prasugrel) et d'autres des inhibiteurs compétitifs actifs sans métabolisation.

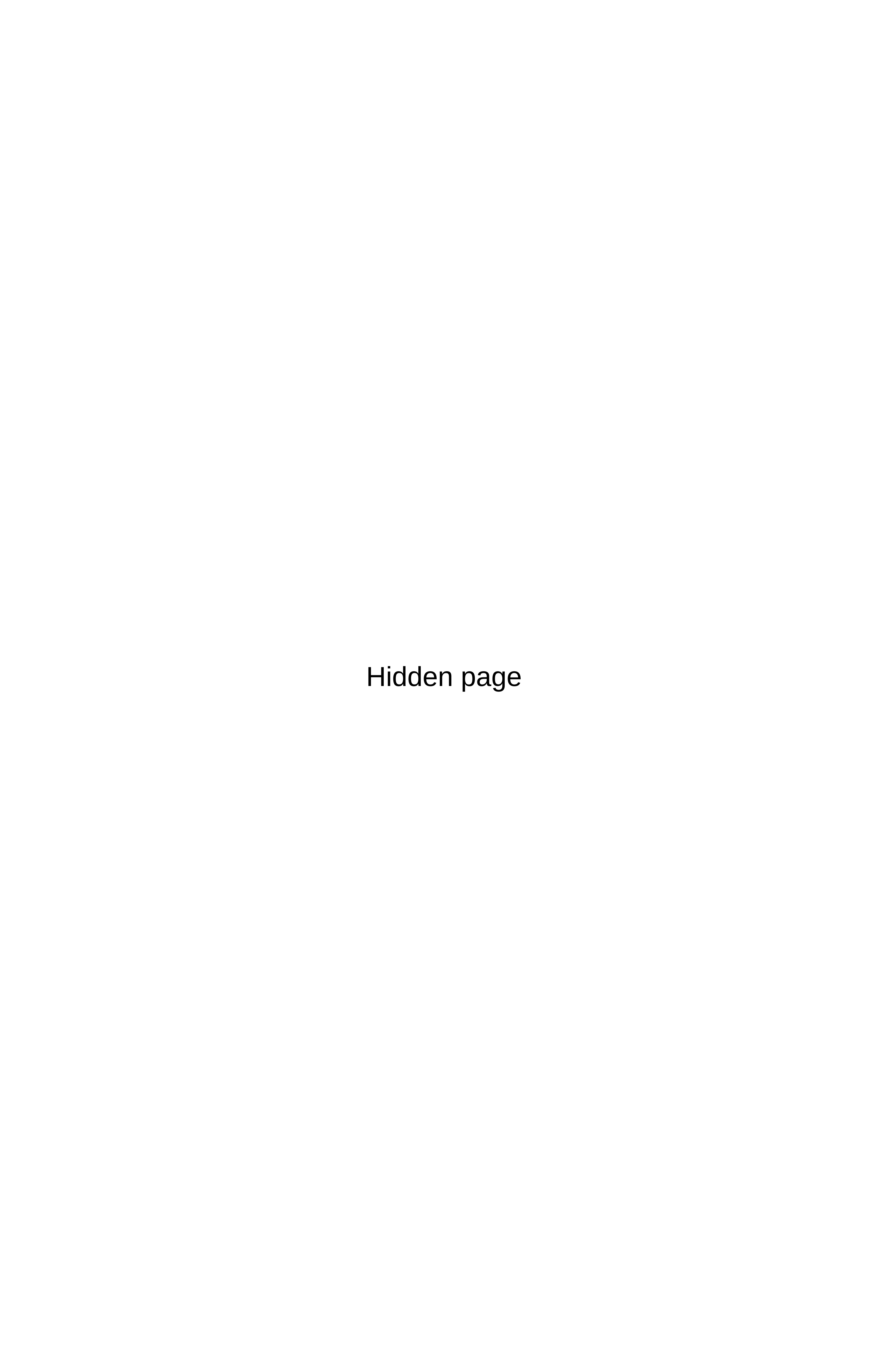
## III. Acides oméga 3 polyinsaturés (Maxepa®)

Remarque : classe anecdotique dans l'arsenal thérapeutique des antiplaquettaires.

L'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA), tous deux acides oméga 3 polyinsaturés, entrent dans la composition du Maxepa®, huile de chair de poisson à forte concentration d'acides gras insaturés. Le Maxepa® est un hypolipémiant indiqué dans le traitement des hypertriglycéridémies endogènes en complément du régime. Précurseurs de séries de prostaglandines comme l'acide arachidonique, EPA et DHA ont, contrairement à celui-ci, des propriétés antiagrégantes *in vitro* et *in vivo*. Ils contribueraient à la diminution des risques d'athérosclérose chez les patients.

# Thrombolytiques et antifibrinolytiques

D. RICHARD, Pharmacie du Centre hospitalier Henri Laborit
et Faculté de pharmacie, Poitiers.
C. CHARPENTIER, Étudiant AHU, Faculté de pharmacie, Poitiers.

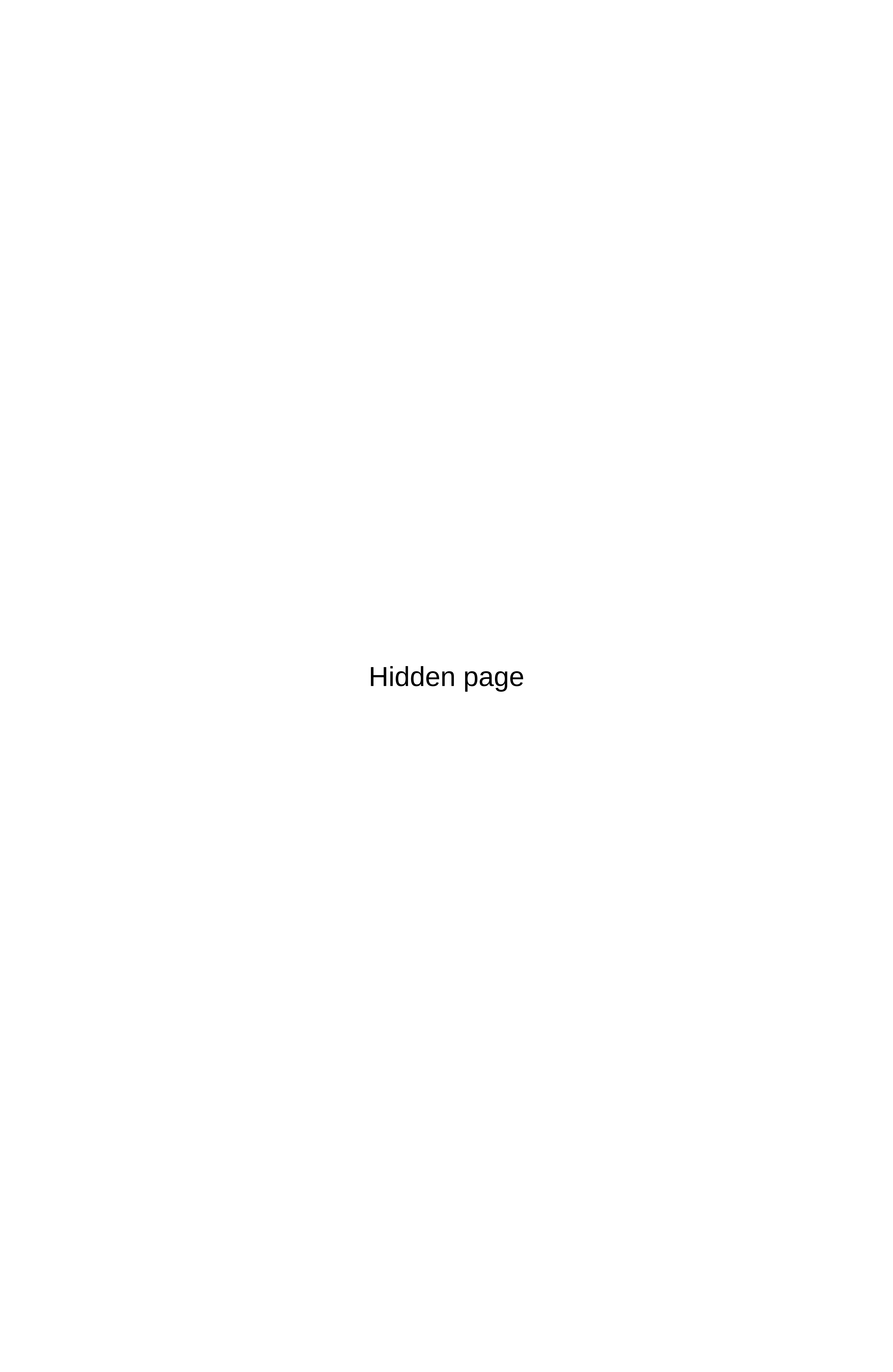

Hidden page

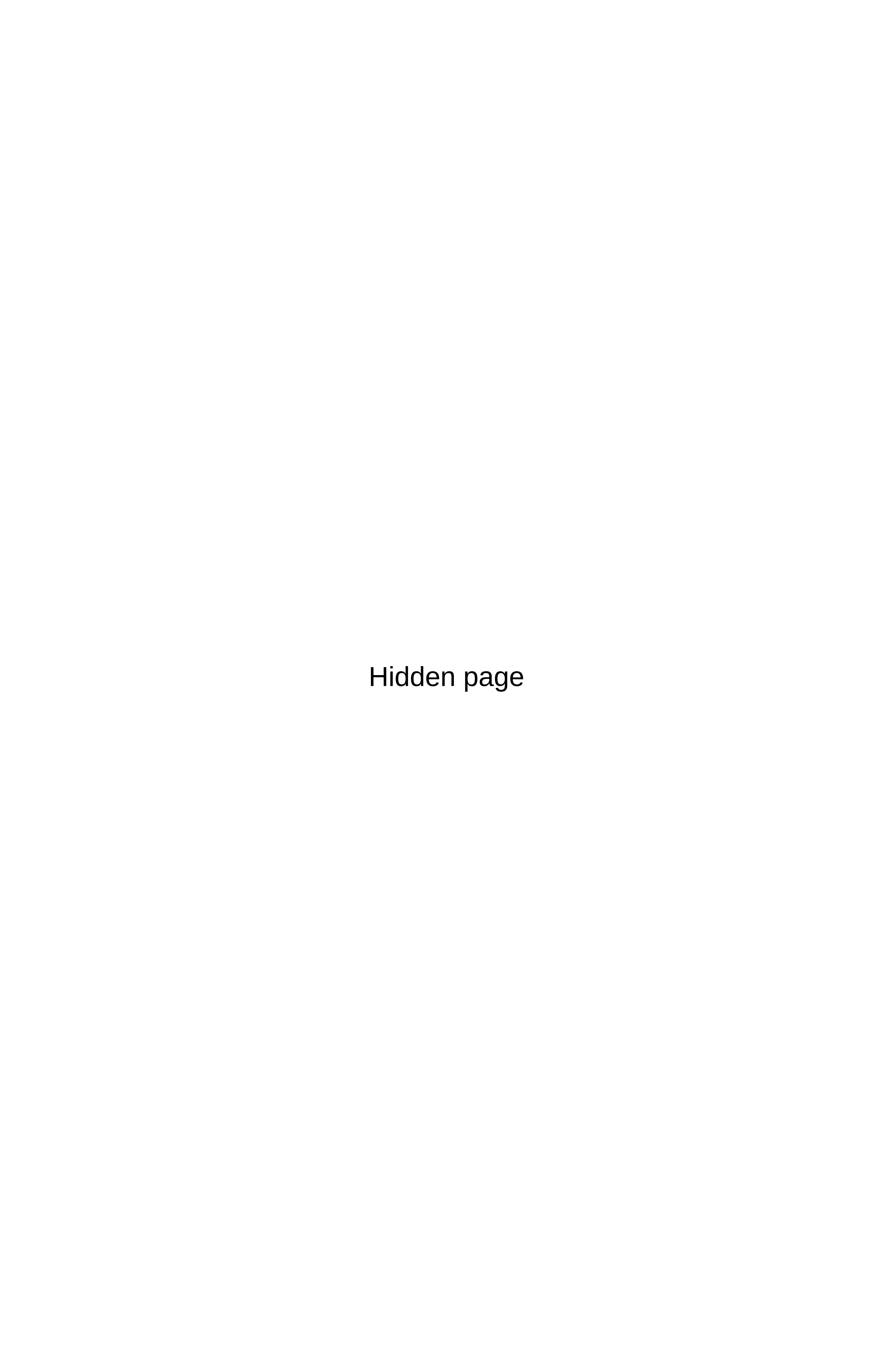
## L'essentiel de la question

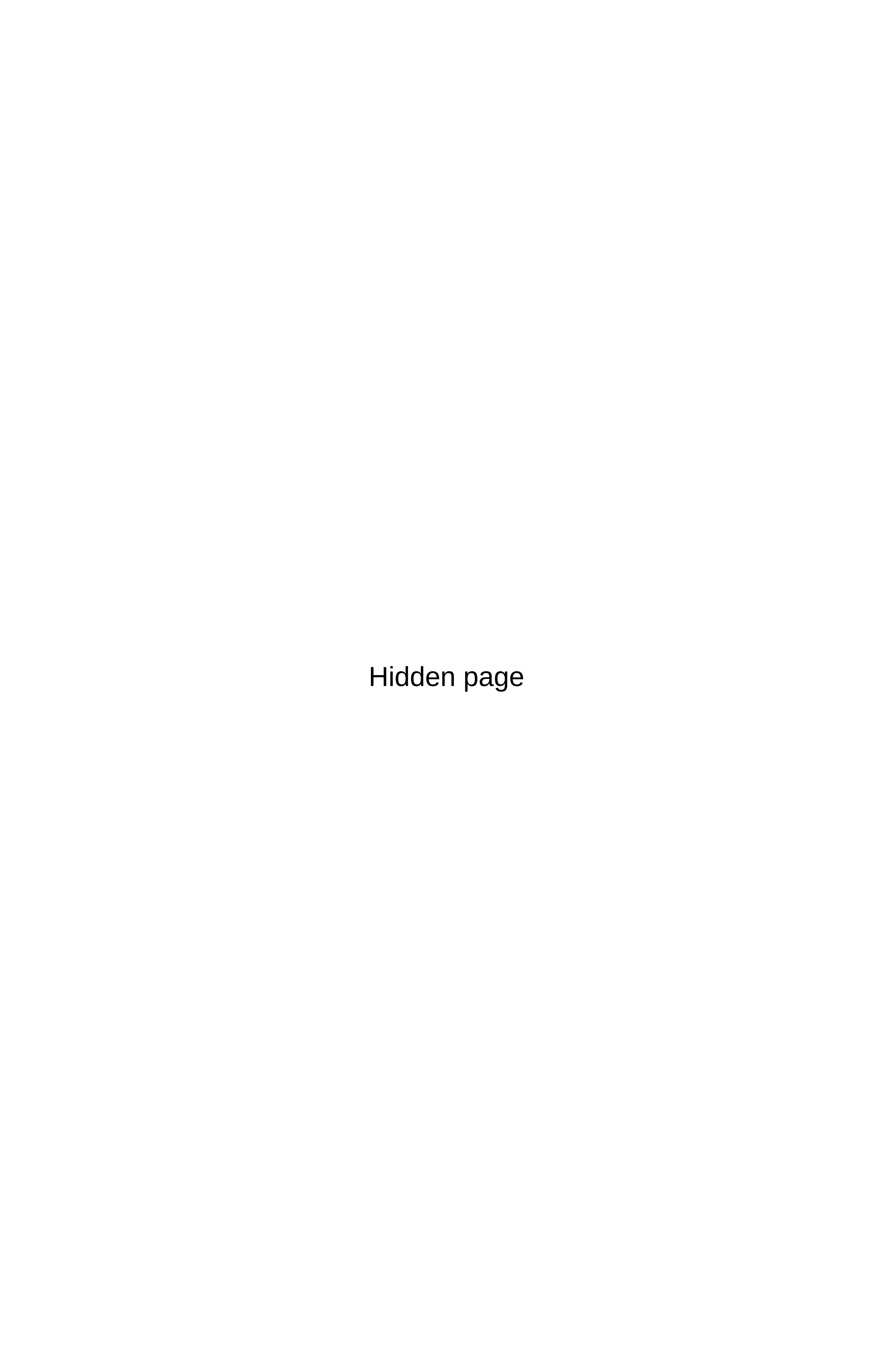
Les agents thrombolytiques occupent une place stratégique dans la prise en charge de la phase aiguë de l'infarctus du myocarde – mais aussi dans les embolies pulmonaires et les thromboses veineuses profondes. Ils permettent d'obtenir une reperfusion coronarienne à court terme et diminuent de façon significative la morbidité et la mortalité dans cette pathologie.
Tous les produits administrés catalysent la transformation du plasminogène en plasmine, puis démasquent le site catalytique de cette enzyme. Leur efficacité est souvent comparable mais leur tolérance n'est pas identique, certaines molécules se révélant fortement antigéniques. Les effets indésirables du traitement sont essentiellement des accidents hémorragiques ou cardiovasculaires, ce qui explique que la majorité des contre-indications visent à prévenir le risque hémorragique.
Le recours aux antifibrinolytiques est d'intérêt plus restreint, mais ces produits trouvent place dans le traitement d'un surdosage par thrombolytique.

***Pour en savoir plus***


- Helft G. *et al.* Nouveaux agents thrombolytiques dans l'infarctus du myocarde. *Archives des maladies du cœur et des vaisseaux*, avril 1999 ; 92 (4) : 411-417.
- Charbonnier B., Pacouret G. Thrombolytiques : principes et règles d'utilisation. *Rev Prat*, 1998 ; 48 (10) : 1137-1140.
- Gulba D. C., Bode C., Runge M. S., Huber K. Thrombolytic agents : an uptaded overview. *Fibrinolysis & Proteolysis*, 1998 ; 12 (suppl. 2) : 39-58.
- Boschat J., Larlet J.-M., Gillard M. Antithrombotiques dans l'infarctus myocardique aigu. *Archives des maladies du cœur et des vaisseaux*, avril 1998 ; 91 (spécial II) : 19-26.
- Dossier technique Métalyse®


Hidden page


Hidden page


Hidden page

# Biochimie
# Hématologie

Retrouvez dans ce tome 2 les disciplines suivantes :

- la génétique,
- la biochimie fondamentale,
- la physiologie,
- la biochimie analytique et clinique,
- l'hémoglobine,
- l'hématologie clinique,
- l'hémostase,
- la thérapeutique.

La collection du Moniteur Internat est devenue un outil de référence pour les pharmaciens et les biologistes, ainsi qu'une base de travail indispensable aux étudiants qui préparent le concours de l'Internat en pharmacie.
Rédigés par une équipe d'auteurs dirigée par Michel Vaubourdolle, biologiste à l'hôpital Saint-Antoine à Paris, les quatre tomes de la collection comportent les connaissances essentielles des disciplines pharmaceutiques et biologiques.

ISBN : 978-2-915585-39-1




www.WK-Pharma.fr

